

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
AU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
FRANÇOIS FABI

CARACTÉRISATION DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LES
PHÉNOMÈNES PATHOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES TISSUS
GYNÉCOLOGIQUES

MAI 2019

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*Je dédie cet ouvrage à mes parents et à Laurye
pour des raisons évidentes que les mots ne
sauraient justement exprimer*

REMERCIEMENTS

Je crois juste de remercier d'abord mes parents pour la somme de leur amour, écoute, support, et la myriade d'autres caractéristiques qu'une famille aimante prodigue et dont l'énumération complète serait souverainement futile de par son insuffisance absolue. Ma réussite est mienne tout autant que leur.

J'aimerais ensuite remercier mon directeur de recherche, Eric Asselin, qui aura stimulé, dès ma deuxième année de baccalauréat, mon désir d'œuvrer en recherche fondamentale. Notre rencontre dans son cours de biologie moléculaire aura amorcé le plus grand et le plus exaltant défi que j'aurai entrepris et c'est grâce à son support constant que j'ai pu atteindre mon objectif final. Eric aura été un directeur qui m'a permis de pleinement me réaliser comme scientifique et qui a imparti toutes les ressources possibles afin d'assurer mon développement intellectuel, autant en supportant invariablement mes projets expérimentaux qu'en critiquant constructivement, et avec une incisivité juste, mes idées et hypothèses. Eric priorise, et ce avant toute autre considération, l'évolution et l'accomplissement de ses étudiants en affichant comme valeurs souveraines la poursuite de l'excellence, l'autonomie et la passion pour la science. J'affirme, avec émotion, que s'aura été un honneur d'avoir le privilège d'œuvrer dans son laboratoire et de pouvoir le qualifier de mentor.

J'aimerais aussi remercier l'irremplaçable Sophie Parent, qui rayonne par son expertise exceptionnelle, sa rigueur enviable et sa bonne humeur contagieuse. Je crois tout à fait juste d'affirmer lui devoir la presque totalité de mes qualités techniques et que sans son support quotidien, il m'aurait été impossible de développer complètement mes aptitudes expérimentales. Son inépuisable savoir n'a d'égal que sa formidable expérience scientifique qui fait d'elle une source intarissable de conseils judicieux. La réussite de toute notre équipe lui revient en partie et je ne saurais exprimer adéquatement l'estime que je lui porte, professionnellement comme personnellement. Merci encore.

Je dois absolument remercier mon mentor et ami, Kevin Brasseur, qui aura été mon premier modèle de jeune scientifique en pleine formation. Alors que je faisais mon entrée au laboratoire, Kevin terminait sa maîtrise et débutait son doctorat; c'est à son contact que j'ai appris la majorité des techniques au laboratoire et il aura été une ressource inestimable pendant mon apprentissage. Kevin aura aussi été un partenaire de congrès, un réviseur

d'articles et de présentations, un accompagnateur dans les dédales labyrinthiques que sont les premières applications de bourses, un modèle d'implication sociale et étudiante et, bien sûr, un collègue que j'aurai eu la chance de côtoyer quotidiennement au laboratoire. Mon expérience à titre d'étudiant gradué n'aurait pas été la même sans lui et c'est un grand privilège de pouvoir le compter aujourd'hui comme ami.

La suite logique de ce remerciement tient en Pascal Adam, qui aura d'abord été mon protégé pour devenir mon collègue. Travailler avec lui aura été un plaisir de tous les instants, autant dans le contexte du laboratoire que dans nos entreprises associatives. J'ai l'intime conviction que Pascal, qui a déjà démontré son excellence en recherche, achèvera un doctorat accompagné de découvertes enrichissantes et c'est un privilège d'avoir participé au développement d'un scientifique de sa trempe. J'espère aussi que ses horizons ne cesseront de s'étendre et qu'aucune mer ne sera épargnée par nos aventures flibustières.

J'ai la chance incomparable d'avoir trop d'amis importants pour les remercier individuellement. Je ne veux donc que signifier la place incomparable qu'ils occupent, supports indéfectibles d'une importance titanesque dans ma réussite académique et mon atteinte du bonheur, seul réel objectif de mon parcours.

Je tiens aussi bien sûr à remercier tous les collègues, et professeurs, des autres laboratoires qui ont animé mes années à l'UQTR. Cette université, microcosme privilégié, fait pour moi plutôt office de milieu de vie que de milieu de travail. Les collègues d'autrefois sont les amis d'aujourd'hui et c'est grâce à vous que j'accomplis maintenant cet ultime projet.

Mention spéciale à mes supérieurs d'autrefois, spécifiquement Josée, Stéphane et Marc. Vos enseignements auront cimenté mon éthique de travail, mon désir de poursuivre l'excellence et mon leadership, des qualités que je sais au cœur de l'éthos de McDonald's; ces apprentissages m'auront servi tout au long de mon parcours, et continueront de le faire.

Le dernier remerciement, mais non le moindre, doit être fait à ma compagne Laurye Massicotte. Tu m'auras permis de m'accomplir entièrement, personnellement comme professionnellement, et tu m'auras supporté à tous les instants de ces dernières années charnières, en m'encourageant constamment à poursuivre mes rêves et objectifs. Les mots manquent pour t'exprimer mon amour et ce sera un privilège souverain de vivre l'entièreté des prochaines étapes de nos vies en ton extraordinaire, et indispensable, compagnie.

RÉSUMÉ

La quête perpétuelle et oppressante de tout organisme vivant tient dans sa lutte incessante d'accroissement de son succès reproducteur, aussi appelé valeur sélective ou fitness. Ce besoin, intransigeant et pénétrant, explique de façon élégante l'une des mesures les plus puissantes de la sélection naturelle et régie, d'un point de vue macroscopique, l'ensemble des caractéristiques définissant chaque être vivant. Le nombre de descendants atteignant la maturité sexuelle faisant office de mesure étalon pour quantifier la valeur sélective d'un individu, il apparaît pertinent de se pencher sur les mécanismes physiologiques et pathologiques affligeant les appareils biologiques supportant ces rôles primordiaux. Dans cet ouvrage, nous nous intéresserons aux diverses fonctions biologiques entourant la reproduction, plus spécifiquement la décidualisation, un processus charnière à l'implantation embryonnaire et les pathologies s'opposant à ce phénomène. Nous traiterons aussi de divers mécanismes moléculaires permettant l'apparition de caractéristiques nécessaires à dissémination des cancers gynécologiques; finalement nous explorerons les rouages moléculaires sur lesquels s'appuient ces mêmes cancers pour exhiber leur létalité exceptionnelle.

Notre travail s'est d'abord concentré sur le rôle de la voie PI3K/AKT, sentier signalétique associé principalement à la réponse trophique de la cellule aux facteurs de croissance, sur le processus transformationnel qu'est la décidualisation. Notre hypothèse, dérivée de certains travaux stipulant que l'endométriose s'appuyait sur cette voie de signalisation pour entraver le processus décidual, stipulait que les isoformes d'AKT exerçaient individuellement un contrôle sur certains mécanismes moléculaires responsables de cette transformation cellulaire. Grâce à la quantification de deux marqueurs spécifiques, l'IGFBP1 et la PRL, nos résultats ont montré que certains membres de la famille des protéines AKT s'opposaient à l'induction de la transformation déciduale. Ces résultats permettront de démarrer une étude subséquente qui validera le rôle physiologique de ces kinases en utilisant un modèle *in vivo* unique, développé dans notre laboratoire.

Nous nous sommes par la suite intéressés au rôle de la protéine Par-4 dans le contexte des cancers gynécologique. Notre hypothèse voulant que Par-4 agissent comme un suppresseur de tumeur capable d'induire l'apoptose s'appuyait sur des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire; toutefois, de multiples observations ont plutôt suggéré que Par-4 agisse comme un inducteur de la transformation épithéliale-mésenchymale. Nos expériences auront démontré la capacité de Par-4 d'induire la transformation cellulaire et l'expression d'une multitude de marqueurs mésenchymaux; son expression, modulée par la voie du TGF- β , semble permettre l'augmentation de la motilité cellulaire, un effet partiellement contrôlé par XIAP. Ces résultats, allant à l'encontre du dogme actuel entourant le rôle de Par-4 et les mécanismes de régulation entourant ses fonctions.

Finalement, afin de tenter d'améliorer l'efficacité des traitements de chimiothérapie octroyés aux femmes touchées de cancers gynécologiques, des thérapies combinées

utilisant à la fois des molécules ciblées et des molécules cytotoxiques ont été étudiées. Accessoirement, l'étude de mécanismes moléculaires caractérisant certaines de ces stratégies avait comme objectif de comprendre et de potentiellement instrumentaliser la dichotomie fonctionnelle de Par-4. Au final, nous auront montré que l'inhibition de l'exportation nucléaire potentialise l'activité du TRAIL l'inhibition de la kinase AKT permet l'augmentation drastique de l'efficacité d'une molécule chimiothérapeutique classique, la doxorubicine. Nos résultats suggèrent aussi que la combinaison de ces composés permet une induction synergique de l'apoptose, un effet permis par la diminution de plusieurs facteurs antiapoptotiques et la régulation positive de plusieurs processus proapoptotiques, et ce, de façon simultanée. Toutefois, rien ne laisse présager que Par-4 est responsable des effets observés.

En somme, nos travaux soulignent le rôle crucial de la voie de signalisation PI3K/AKT dans les processus moléculaires autant physiologiques que pathologiques et éclaircis, de façon malheureusement imparfaite, le rôle et les mécanismes de régulation de la protéine Par-4. Notre travail érige les fondements théoriques qui serviront à conduire des études précliniques qui permettront, plausiblement, de cimenter notre compréhension de plusieurs phénomènes entourant la reproduction, la tumorigénèse et la chimiorésistance.

Mots-clés : AKT, PI3K, Par-4, CRMI, chimiorésistance, décidualisation, EMT, AZD5363, leptomycin B

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	V
LISTE DES FIGURES	XIII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Histologie et régulation endocrinienne de l'utérus et de l'ovaire	1
1.2 Décidualisation et infertilité.....	7
1.2.1 Régulation moléculaire de la décidualisation	10
1.3 Voie de signalisation PI3K/Akt.....	14
1.3.1 Histoire de la découverte d'Akt	16
1.3.2 Régulation de l'activation d'Akt.....	16
1.3.3 Régulation de FOXO par Akt	20
1.3.4 Régulation de GSK3 par Akt.....	21
1.3.5 Régulation de la voie mTOR par Akt.....	22
1.4 L'infertilité	24
1.4.1 L'endométriose	25
1.5 Le cancer.....	27
1.5.1 La progression oncogénique	29
1.5.2 La transition épithéliale-mésenchymale	36
1.5.3 Le cancer ovarien	39
1.5.4 Le cancer endométrial	41
1.5.5 Apoptose.....	44
1.6 Chimiothérapie et chimiorésistance.....	49
1.6.1 Rôle de la voie PI3K/Akt dans la chimiorésistance	56
1.6.2 Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt	60
1.6.3 CRM1	62
1.6.4 Par-4	65
1.7 Problématique et objectifs de la recherche	70

CHAPITRE II	
PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE-4 MEDIATES TGF-<i>B</i>-INDUCED EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION.....	75
2.1 Contribution des auteurs	75
2.2 Résumé de l'article	75
2.3 Article complet (anglais) : Prostate apoptosis response-4 mediates TGF- β - induced epithelial-to-mesenchymal transition	78
Abstract	78
Introduction	79
Materials and methods	81
Cell lines and reagents.....	81
Treatments and transfections with constructs and siRNA.....	81
Reverse transcriptase PCR (RT-PCR).....	82
Western blot analysis.....	83
Immunofluorescence microscopy analysis.....	83
Cell migration and wound healing assay.....	84
ChIP assay.	84
Statistical Analysis.	85
Results.....	85
TGF- β signaling upregulates Par-4 expression.....	85
TGF- β -mediated Par-4 upregulation occurs through both Smad-dependent and Smad-independent pathways.	86
Par-4 promoter region contains Smad-binding elements (SBE).....	90
Par-4 expression is increased during TGF- β -induced EMT.....	91
Par-4 directly upregulates other EMT inducers.	93
XIAP regulates Par-4 cleavage in normal and malignant cells.	96
Par-4 cleavage inhibits its ability to induce increased cell motility and EMT-like characteristics.	98
Discussion	99
Acknowledgements.	102
References.....	102

CHAPITRE III REGULATION OF THE PI3K/AKT PATHWAY DURING DECIDUALIZATION OF ENDOMETRIAL STROMAL CELLS107

3.1	Contribution des auteurs	107
3.2	Résumé de l'article (français)	107
3.3	Article complet (anglais) : Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells.....	110
	Abstract	110
	Introduction	111
	Material and methods	114
	Cell culture.....	114
	Reagents and antibodies	114
	In vitro decidualization induction of HIESC	114
	Prolactin assays	115
	Proteasomal inhibition.....	115
	Protein extraction and western blot analysis	115
	Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR and qRT- PCR)	116
	Production of HIESC cell lines with Tet-inducible constitutive active Akt isoforms	117
	In vitro decidualization of Tet-inducible HIESC cell lines	118
	Wound healing assay.....	118
	Immunofluorescence	119
	Statistical analysis	119
	Results.....	120
	Decidualization of HIESC	120
	Expression of Akt isoforms during in vitro decidualization.....	122
	In vitro modulation of PI3K/Akt activity and other pathways upon induction of decidualization	127
	Effect of decidualization on Par-4 and p65 localization	130
	Effect of PI3K/Akt pathway inhibition on cell motility.....	132
	Effect of constitutive active Akt isoforms on the decidualization process	134

Discussion	136
Acknowledgments	140
References	140

CHAPITRE IV

INHIBITION OF CRM1 ACTIVITY SENSITIZES ENDOMETRIAL AND OVARIAN CELL LINES TO TRAIL-INDUCED CELL DEATH145

4.1 Contribution des auteurs	145
4.2 Résumé de l'article (français)	145
4.3 Article complet (anglais): Inhibition of CRM1 activity sensitizes endometrial and ovarian cell lines to TRAIL-induced cell death	147
Abstract	147
Introduction	148
Material and methods	151
Cell lines and reagents	151
Flow cytometry	152
MTT assays	152
Western blot analysis	153
Colony formation assays	153
RT-qPCR	153
siRNA and transfections	154
Immunofluorescence	154
Statistical analyses	155
Results	155
Leptomycin B combination therapy significantly reduces cell viability in a tumor specific manner	155
Combination of cisplatin or TRAIL with leptomycin B synergistically induces apoptosis induction in endometrial cancer cell lines	158
Combination of cisplatin or TRAIL with leptomycin B synergistically induces apoptosis induction in ovarian cell lines	160
Combination of TRAIL and leptomycin B synergistically induces extrinsic and intrinsic apoptotic programs in a p53-independent manner.	162

Combination of TRAIL and leptomycin B significantly reduces tumor cells ability to clonally proliferate in a p53 independent manner.	165
Leptomycin B, both singly and in combination with chemotherapeutic agents, modulates the expression of crucial apoptotic pathway genes in a cell-type specific manner	167
Discussion	169
Conclusions	173
References	173
CHAPITRE V	
AZD5363 AND DOXORUBICIN SYNERGISTICALLY INDUCE APOPTOTIC CELL DEATH IN ENDOMETRIAL AND OVARIAN CANCER CELL LINES.....	180
5.1 Contribution des auteurs	180
5.2 Résumé de l'article (français)	180
Abstract.....	181
Introduction.....	182
Methods.....	184
Cell lines and reagents.....	184
MTT assays.....	184
Western blot analysis.....	185
Colony formation assays	185
Immunofluorescence	185
Statistical analyses	186
Results.....	186
NVP-BEZ235 and AZD5363 are capable of interfering with the PI3K/Akt/mTOR axis in ovarian and endometrial cancer cell lines.	186
NVP-BEZ235 and AZD5363 are capable of enhancing the ability of cisplatin and doxorubicin of reducing cancer cell viability.....	188
AZD5363 potentiates the activity of doxorubicin and allow the induction of apoptosis	190
Combination of AZD5363 and doxorubicin regulates key modulators of the apoptotic responses as well as the translocalisation of tumor suppressors	192

Combination of AZD5363 and doxorubicin significantly decreases tumor cells ability to replicate clonally	193
Discussion	195
Conclusion	197
Declarations.....	197
Funding	198
Authors' contributions.....	198
References	198
Tables	202
Supplementary figures	202
CHAPITRE VI	
DISCUSSION ET CONCLUSION	204
6.1 Limitations méthodologiques implicites.....	204
6.2 Les isoformes d'Akt dans le contrôle du processus de décidualisation.....	205
6.3 La place sibylline de Par-4 dans l'induction de l'apoptose	213
6.4 L'utilisation de thérapie combinée comme stratégie thérapeutique	221
6.5 Conclusion	227
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	231
ANNEXE A	
EXPRESSION, ACTIVATION, AND ROLE OF AKT ISOFORMS IN THE UTERUS	264

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.2 Anatomie macroscopique des organes reproducteurs féminins.....	3
Figure 1.3 Représentation diagrammatique des régulations endocriniennes du cycle menstruel	6
Figure 1.4 Représentation diagrammatique des mécanismes moléculaires sous-jacents à la décidualisation	12
Figure 1.5 Structure des isoformes d'Akt	18
Figure 1.6 Schéma récapitulatif des voies de signalisation contrôlées par Akt.	20
Figure 1.7 Modèle stochastique de l'émergence tumorale.....	27
Figure 1.8 Statistiques sur le cancer au Canada	29
Figure 1.9 Capacités distinctives du cancer	32
Figure 1.10 Rôle et séquence d'incidence des mutations pilotes dans la progression tumorale.....	34
Figure 1.11 Modèle arborescent de l'apparition des populations cellulaires cancéreuses	35
Figure 1.12 Mutations répertoriées dans les cancers ovariens	41
Figure 1.13 Mutations répertoriées dans les cancers utérins.....	43
Figure 1.14 Illustration diagrammatique des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.....	48
Figure 1.15 Représentation diagrammatique des voies de signalisation impliquées dans la chimiorésistance médiée par Akt	59
Figure 1.16 Représentation diagrammatique du mécanisme d'extrusion nucléaire opéré par CRM1.....	63
Figure 1.17 Expression et structure de la protéine Par-4	66
Figure 1.19 Représentation sommaire des voies de signalisation entourant notre hypothèse de recherche quant au rôle d'Akt dans la décidualisation.....	71
Figure 6.1 Localisation intracellulaire des isoformes d'Akt en fonction du grade tumoral.....	209
Figure 6.2 Récapitulation schématique des voies de signalisation associée à la biosynthèse de microARN.....	212

Figure 6.3	Essais MTT en avec leptomycine B et TRAIL à dose croissante.....	214
Figure 6.4	Immunofluorescence de Par-4 en présence de leptomycine B et de TRAIL	216
Figure 6.5	Carte schématique de la protéine Par-4	219
Figure 6.6	Représentation diagrammatique des voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des cellules par la combinaison de la doxorubicine et de l’AZD5363	224
Figure 6.7	Représentation diagrammatique de l’expérimentation pré-clinique de la thérapie combinée AZD5363 et doxorubicine.....	226

CHAPITRE

INTRODUCTION

1.1 Histologie et régulation endocrinienne de l'utérus et de l'ovaire

L'appareil reproducteur féminin, illustré en figure 1.1, est composé de plusieurs organes, à savoir externes et internes. La vulve, composée du vestibule vaginal, des lèvres, du clitoris, du mont du pubis et des glandes de Bartholin, assure les fonctions mécaniques permettant l'entrée du sperme dans l'organisme; ces organes sont, comme leur nom l'indique, situés à l'extérieur de l'abdomen de la femme [1]. Pour leur part, les organes reproducteurs internes féminins, à savoir l'utérus, les trompes utérines les ovaires et la portion supérieure du vagin, se situent dans la cavité abdominale et pelvienne. Les fonctions de ces organes sont évidemment de permettre la production gamétique, la sécrétion d'hormones stéroïdiennes, la fécondation éventuelle d'un ovule par un spermatozoïde et le support de la croissance du zygote qui émergerait de cet événement [2].

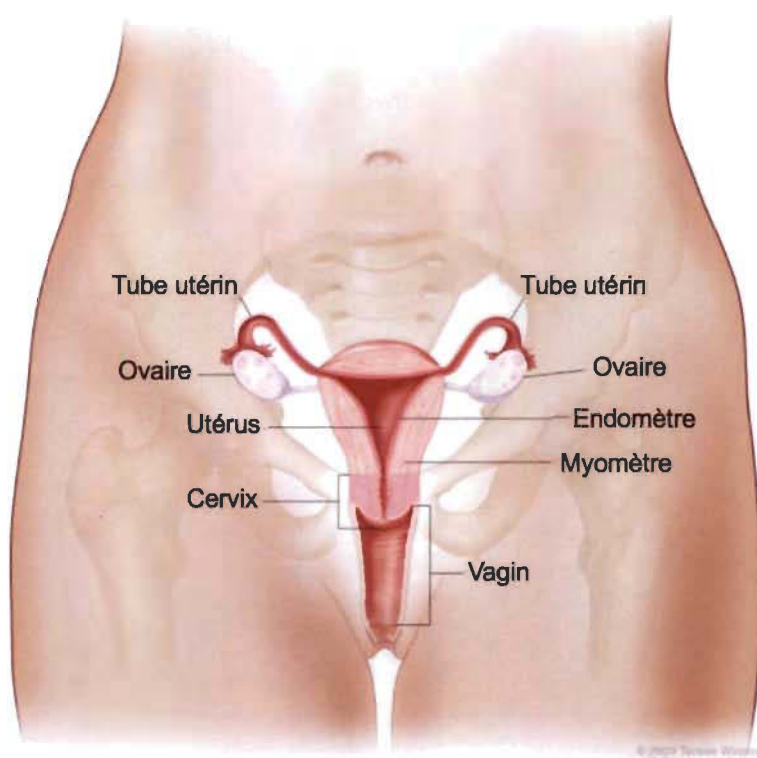


Figure 1.1 Anatomie macroscopique des organes reproducteurs féminins
Adapté de Uterine Sarcoma Treatment du NIH

L'utérus, situé au centre du pelvis, en face du rectum et derrière la vessie, est un organe musculueux ancré dans la cavité abdominale par plusieurs ligaments assurant son anteroversion et son support. Tel que montré en figure 1.2, on retrouve trois couches tissulaires principales composant cet organe : la séreuse, couche externe de l'utérus équivalent à un péritoine et formé par un mésothélium superficiel, le myomètre, une couche musculieuse externe formée de cellules musculaires lisses supportées par un stroma et l'endomètre [3], la couche interne de l'utérus formée d'un stroma d'épaisseur variable et d'une couche de cellules épithéliales prismatiques ciliées et sécrétoires [4]. L'endomètre peut être subséquemment divisé en couche fonctionnelle et couche basale; alors que l'épaisseur et la vascularisation de la couche basale restent plutôt constantes à travers le cycle menstruel, la couche fonctionnelle subira plusieurs changements occasionnés par les fluctuations hormonales propres à ces variations cycliques [5]. En effet, la couche fonctionnelle va croître et proliférer pour ensuite s'éroder en l'absence

d'une implantation concluante; nous discuterons plus en profondeur de ce concept dans les sections à venir. L'endomètre est aussi caractérisé par la présence d'une multitude d'invaginations qui forment des glandes utérines pénétrant le stroma. Ces dernières présentent des fonctions sécrétoires multiples permettant, notamment, de générer un environnement propice à l'implantation embryonnaire [6].

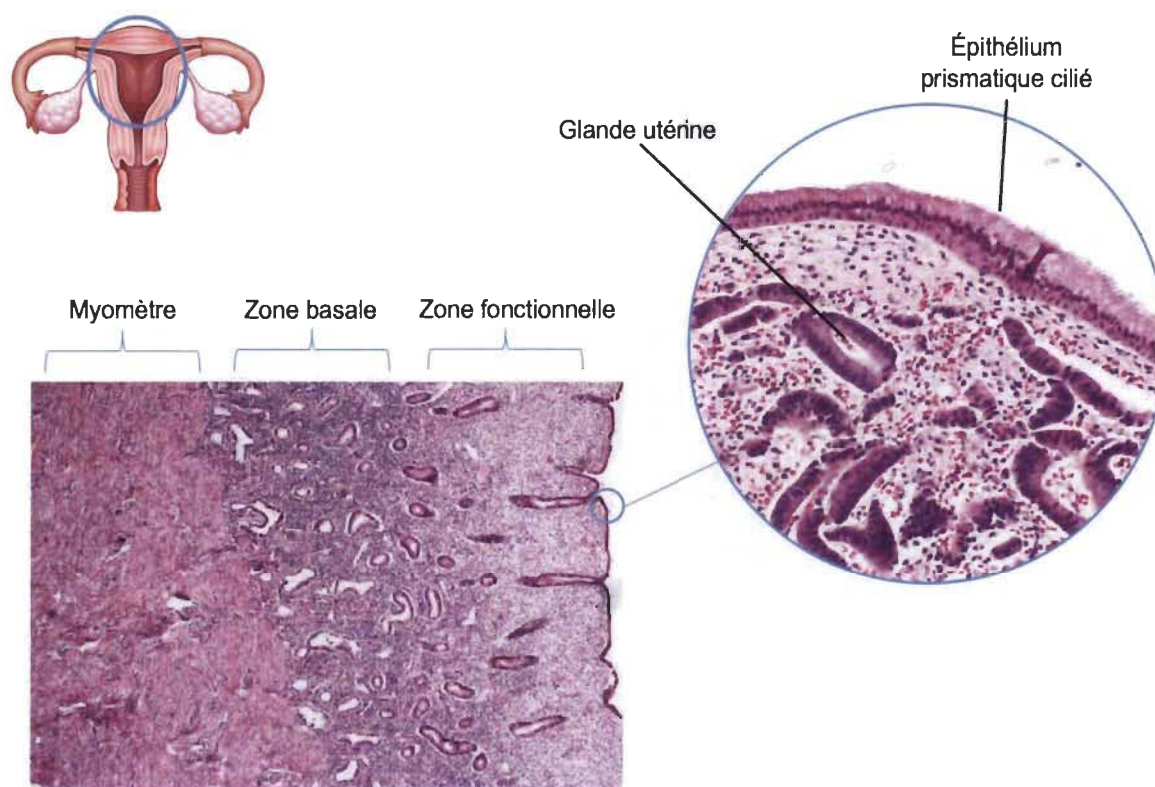


Figure 1.2 Anatomie macroscopique des organes reproducteurs féminins
(Adapté de Uterine Sarcoma Treatment du NIH)

Notre intérêt sera concentré principalement sur les fonctions et mécanismes régissant l'utérus et l'ovaire, unités fonctionnelles fondamentales de la reproduction féminine. Nous ne nous attarderons pas non plus sur l'implication de l'axe hypophysaire-hypothalamique dans le contrôle endocrinien des fonctions sexuelles; il apparaît toutefois pertinent de souligner brièvement leurs fonctions générales, particulièrement en ce qui a trait aux fonctions de folliculogénèse, mission cruciale des ovaires. L'hypothalamus, situé juste au-dessus du tronc cérébral, sécrète la GnRH, ou gonadolibérine [6]. Comme son nom l'indique, cette dernière a comme fonction principale de stimuler la sécrétion

d'hormone lutéinisante (LH) et d'hormone folliculo-stimulante (FSH) par les cellules gonadotropes situées dans la glande antéhypophysaire. Ces deux hormones, aussi appelées gonadotropines, auront comme effet respectif de permettre la production d'estrogène et de stimuler le recrutement, la croissance, la sélection et la dominance des follicules ovariens [7]. Plus spécifiquement, la LH, en agissant sur les cellules de la thèque interne, stimulera la biosynthèse d'androstènedione à partir de cholestérol; cette hormone au faible potentiel androgénique sera récupérée par les cellules de la granulosa et servira prestement de précurseur dans la synthèse d'estradiol via l'aromatase, une enzyme dont l'expression dépend de la FSH [8]. Les cellules de la thèque, en réponse à la LH, auront aussi la capacité de produire de faibles quantités de progestérone. En somme, une augmentation croissante de FSH et de LH permettra donc la synthèse grandissante d'estradiol et de progestérone; certaines données suggèrent même que la présence d'estradiol permettrait à la FSH d'induire la formation de récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa, stimulant la sécrétion de petites quantités de progestérone, ce qui pourrait initier une boucle de rétrocontrôle positif sur l'hypophyse et découpler la sécrétion de LH [9]. C'est aussi cette augmentation soutenue de la sécrétion de progestérone qui permettra la préparation du corps jaune, organe temporaire de sécrétion endocrinienne. Ce dernier produira une grande quantité de progestérone et d'estradiol, production d'abord stimulée par la LH et ensuite supportée, dans le cas d'une implantation fructueuse, par l'analogue placentaire de la LH, le hCG. Le placenta prendra éventuellement le relais de la production de progestérone [10]. Ces mécanismes endocriniens s'inscrivent tous dans un schème cyclique plus complexe, le cycle menstruel. En effet, la capacité d'un ovule à être fécondé est intrinsèquement liée à la cyclicité des menstruations; on dénote trois phases principales à ce cycle menstruel, à savoir la phase folliculaire, ovulatoire et lutéale [11].

Sommairement, la phase folliculaire est caractérisée par de faibles niveaux de LH et de FSH, ce qui implique, en l'absence d'embryon en développement, des niveaux d'estrogènes et de progestérone faibles. La présence en importante quantité de ces deux hormones diminue drastiquement la sécrétion de FSH et de LH par rétrocontrôle négatif. Le mécanisme exact permettant cette régulation négative reste encore nébuleux. Il semble presque certain que la capacité de la progestérone à inhiber la sécrétion de GnRH dépend

de la présence de l'estradiol et de la sensibilité de certains neurones à ce stéroïde [12]. Conséquemment, le rôle de l'estradiol semble charnière au mécanisme de régulation moléculaire permettant l'effet rhéostatique de la sécrétion d'hormones stéroïdiennes sur la libération de GnRH et, implicitement, des gonadotropines. De façon très intéressante, les neurones responsables de la pulsation de GnRH ne sont que très peu sensibles à la progestérone ou à l'estradiol, suggérant un intermédiaire fonctionnel régissant ces processus [13]. Des données récentes suggèrent que l'estradiol, en fonction de sa concentration sérique, permet l'activation préférentielle de ER α et ER β au sein de neurones spécifiques capables de libérer la kisspeptin, peptide stimulant de façon importante la libération de LH [14]. Alors que ER α semble responsable de l'augmentation de la transcription et de la libération de la kisspeptine, et donc la création du pic de LH permettant l'ovulation, il semblerait que ER β occupe une place opposée dans ce système, permettant la régulation négative de la LH en phase folliculaire comme lutéale [15-18]. En somme, l'absence d'estrogène et de progestérone favorise donc le rehaussement des niveaux de FSH et de LH via des mécanismes complexes et mal élucidés [7], mais qui convergent malgré tout vers le recrutement et la croissance folliculaire. L'émergence invariable de follicules recrutés permettra la production progressive d'estradiol, qui inhibera préférentiellement, de pair avec la production d'inhibine B, la libération de FSH au profit de la LH [19]. Il semble important de préciser que pendant cette phase, la production de FSH et de LH reste inchangée et que c'est principalement à travers la modulation de leur sécrétion qu'on peut expliquer leurs niveaux sériques changeants. Au terme de cette phase, un seul follicule émergera comme dominant et s'engagera dans la suite du processus.

La phase ovulatoire est caractérisée par la libération de l'ovule qui émergera du processus de sélection et, subséquemment, de dominance de la phase précédente. Lorsque ce dernier aura atteint un niveau de maturation suffisant, le follicule aura la capacité de maintenir des niveaux d'estradiol se trouvant environ à 200pg/mL pendant au moins 48h [20, 21]; ce seuil critique provoquera la libération massive de LH et de FSH emmagasiné précédemment dans l'hypophyse. Cette décharge paroxysmale de LH aura comme effet, entre autres, de permettre le relâchement de protéases servant à diminuer l'intégrité de la

membrane folliculaire, facilitant la rupture folliculaire et l'expulsion de l'ovule dans la cavité péritonéale et sa recapture éventuelle par le fimbria des tubes utérins [22, 23]; le pic de LH permettra aussi la vascularisation du follicule devenu maintenant corps jaune ainsi que le début d'une production massive de progestérone par ce dernier [24].

La phase lutéale, phase finale de ce processus cyclique, est marquée par la présence du corps jaune qui produira des doses croissantes de progestérone [9, 24]. Cette production incrémentale d'hormone progestative aura comme effet de provoquer l'augmentation des sécrétions utérines et la décidualisation, que nous aborderons plus loin dans cet ouvrage. L'augmentation soutenue de la genèse d'hormones stéroïdiennes pendant la phase lutéale provoquera l'affaissement des niveaux de LH et FSH, une déplétion qui stimulera la diminution des taux d'estradiol et de progestérone; en l'absence d'un embryon qui produirait normalement du hCG grâce à son placenta nascent, le corps jaune dégénérera et laissera sa place au corps blanc [25]. S'ensuivra une répétition de ce cycle, tel que schématisé en figure 1.3, en débutant à nouveau par la phase folliculaire.

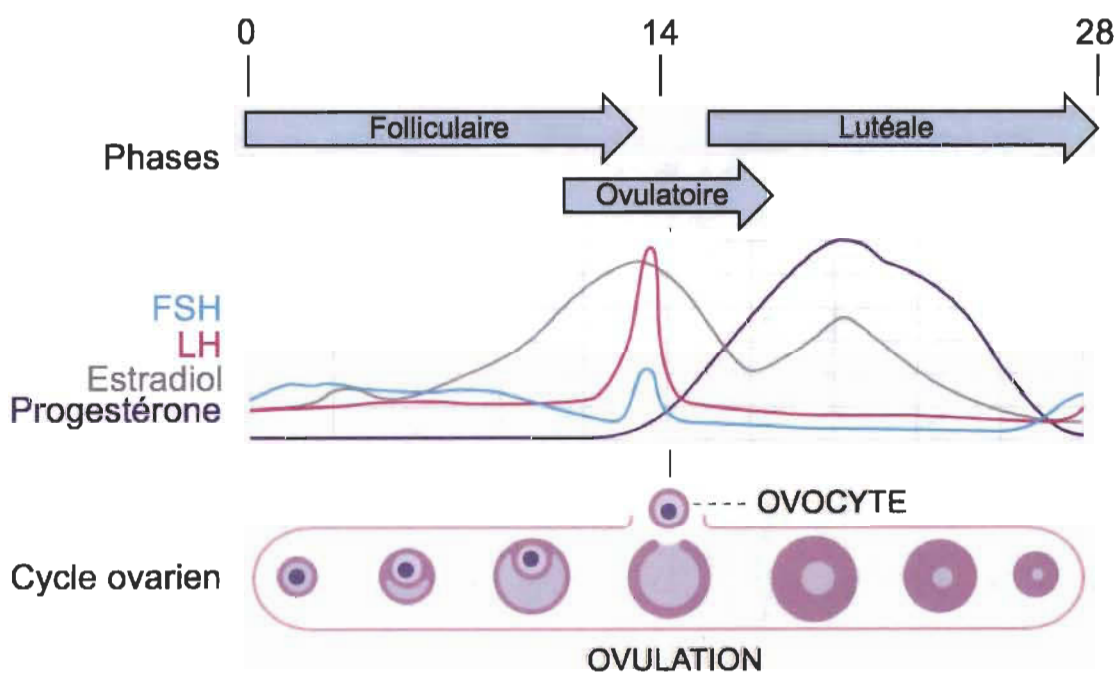


Figure 1.3 Représentation diagrammatique des régulations endocriniennes du cycle menstruel
(Adapté de Wikipedia, Reed et al. 2018)

L'utérus, pour sa part, est aussi régi par ces oscillations hormonales. Pendant la phase proliférative de l'endomètre, qui correspond à la deuxième moitié de la phase folliculaire du cycle menstruel, l'estradiol stimule la prolifération des cellules de la couche fonctionnelle ainsi que la croissance, la complexification et la vascularisation des glandes utérines; parallèlement, l'influence œstrogénique augmente la réceptivité des cellules endométriales à la progestérone en augmentant l'expression des récepteurs pour cette hormone [7, 26]. Cette augmentation marquée de l'expression des récepteurs permettra l'entrée dans la phase sécrétoire qui débute de concert avec l'ovulation. Afin de préparer l'endomètre à l'implantation potentielle d'un embryon, la progestérone, produite massivement par le corps jaune nouvellement généré, agira sur l'endomètre maintenant dense, vascularisé et arborant une éminente sensibilité à l'égard de l'influence progestative [2]. Les cellules stromales, allongées et fibroblastiques, subiront des changements morphologiques et fonctionnels profonds, un processus appelé décidualisation. Ce mécanisme, crucial à l'implantation embryonnaire, occupe une place charnière dans les processus reproductifs [7, 27].

1.2 Décidualisation et infertilité

Afin d'accommoder l'implantation embryonnaire, la couche déciduale de l'endomètre doit subir une transformation nommée décidualisation. De façon très intéressante, le terme decidua, à savoir la couche tissulaire résultant de la transformation déciduale, provient du latin *decidere* « qui se détache ». En effet, la couche déciduale, à la conclusion d'un cycle menstruel n'ayant pas été soldé par l'émergence d'un zygote et le support hormonal engendré par le système endocrinien placentaire, se détériorera irréversiblement pour éventuellement être excrétée; c'est là le processus qu'on nomme menstruation. Il apparaît important de mentionner que les processus décrits ici s'appliquent principalement à la décidualisation humaine, un phénomène nécessaire à l'invasion trophoblastique de laquelle émergera le placenta; de surcroît, la décidualisation cyclique de l'endomètre, sans influence extrinsèque émanant du conceptus, n'est retrouvée que dans quelques espèces [28, 29]. Ce type de spécialisation fonctionnelle semble accommoder particulièrement les espèces nécessitant un placenta présentant des

villosités placentaires directement en contact avec le sang maternel, une ovulation spontanée, le développement d'une progéniture de faible nombre et la présence de menstruations [30, 31].

D'un point de vue histologique, les cellules stromales subissent des modifications conséquentes lors de la décidualisation. En effet, lors de la phase proliférative, les cellules stromales présentent des caractéristiques stromales classiques, à savoir un réticulum endoplasmique développé, un cytoplasme étroit et un noyau unitaire allongé; la décidua, elle, est caractérisée par cellules exhibant des caractéristiques plus épithéliales, à savoir une forme pavimenteuse pseudo-polyhédrique parfois binuclées, des noyaux plus volumineux et présentant des nucléoles plus nombreux. Ce changement phénotypique, antithétique à la transition épithéliale-mésenchymale (epithelial to mesenchymal transition; EMT), n'est pas sans rappeler le mécanisme de transformation d'un phénotype mésenchymal vers épithélial, processus par lequel les cellules fibroblastiques acquièrent des caractéristiques moléculaires et morphologiques propres aux cellules pavimenteuses [32-34]; ce concept sera abordé de façon plus étendue dans les sections subséquentes du présent ouvrage. On constatera aussi une accumulation de glycogène et de gouttelettes lipidiques au sein des cellules, marque classique des cellules déciduales [35-37]. Cette remodelisation remarquable du tissu endométrial permettant d'établir l'interface nécessaire à l'interaction foeto-maternelle, exige une régulation temporelle éminemment stricte. En effet, cette fenêtre d'implantation, période au cours de laquelle l'utérus déploie de multiples mécanismes moléculaires afin d'offrir un environnement permettant l'ancrage du blastocyste dans la décidua, est plutôt brève. Au moment du contact entre le blastocyste et la paroi endométriale, trois étapes se succèdent pour permettre la nidation : l'apposition, l'adhésion et l'invasion [38]. L'apposition consiste en un contact entre le blastocyste, partiellement dégainé de sa zone pellucide, et l'endomètre; cette interaction, très fragile, sera renforcée par la pénétration de protrusions trophoblastiques qui caractérisent la phase d'adhésion. Une invasion plus prononcée dirigée par le syncytiotrophoblaste, formé de cellules pénétrantes issues de la fusion entre la couche cellulaire maternelle et embryonnaire, signifiera l'atteinte de l'ultime étape de l'implantation embryonnaire, l'invasion.

La décidualisation sera nécessaire à ces processus d'interaction en permettant la modulation de tout le paysage transcriptionnel et traductionnel des cellules des glandes utérines. Sans désigner et approfondir la totalité de ces modifications, qui sont d'une complexité considérable, nous en identifierons les principales. Tout d'abord, l'expression de récepteurs qui interagiront avec les protéoglycans exprimés à la surface du blastocyste permettra leur arrimage mutuel [39]. De plus, la décidua exprimera des taux élevés de facteur de stimulation des colonies -1 (CSF-1), nécessaire à l'attachement du blastocyste et à la placentation subséquente [40, 41]. La décidualisation permettra aussi l'expression d'une multitude de facteurs afin de permettre l'attachement et la création subséquente d'un intime réseau vasculaire entre l'embryon et le tissu maternel. Cette néovascularisation déciduale semble principalement régie par l'augmentation et le relâchement marqué du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et le facteur de croissance fibroblastique (FGF) par les cellules stromales décidualisées. Cette augmentation, sous le contrôle de l'estrogène et de la progestérone, permet la maturation et l'organisation vasculaire nécessaire au soutien embryonnaire [42, 43]. L'augmentation marquée de la prokinéticine-1 (PROK1), cytokine dont l'expression du récepteur semble sous le contrôle de la progestérone [44], apparaît aujourd'hui comme l'un des événements déterminants du processus de décidualisation. Cette protéine, décrite relativement récemment et ayant comme fonction principale le support de la croissance des glandes endocrines, diminuera la prolifération des cellules épithéliales, augmentera l'angiogenèse et accentuera la perméabilité des cellules endothéliales circonscrivant les artères spiralées [45-47]. PROK1 semble aussi responsable de l'expression de la cyclo-oxygénase 2, enzyme nécessaire à la production des prostaglandines et au maintien de la grossesse [48]; finalement, ce facteur de croissance apparaît comme aussi capable de stimuler l'expression de leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6) et IL-11 par les cellules épithéliales et stromales de la décidua, événements nécessaires à la réceptivité utérine [47, 49-53].

Il semble pertinent de noter que plusieurs démonstrations supportent l'idée que l'expression de ces protéines est contrôlée de façon directe par les hormones stéroïdiennes

[43, 44, 54, 55]; toutefois, certaines protéines, comme LIF, l'insulin growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) et la prolactine (PRL), ne semble pas être induit sous l'influence singulière de ces hormones, soulignant l'importance de la signalisation réciproque entre les cellules constituant la décidua avec l'embryon en voie d'implantation; ensemble, ils généreront un environnement qui potentialise le programme de décidualisation de façon cohérente et soutenue [56]. L'accomplissement du programme décidual semble qualifiable, généralement, par l'expression de IGFBP1 et PRL, l'accroissement de ces deux marqueurs étant largement considérés comme l'indicateur le plus valide de l'induction de la décidualisation [57-59]. De ce fait, les mécanismes moléculaires entourant la régulation de ces deux protéines essentielles méritent une attention en regard de l'avènement du programme décidual.

1.2.1 Régulation moléculaire de la décidualisation

Nonobstant les évidences démontrant que la progestérone agit comme instigatrice de la décidualisation, une multitude de données suggèrent que cette dernière est insuffisante, lorsqu'utilisée seule, pour induire tous les changements observés lors de ce processus. En effet, l'expression de très peu de gènes modulés lors de la décidualisation semble répondre directement à un traitement progestatif, et ce, malgré la présence dans les cellules endométriales stromales de tout l'appareillage moléculaire nécessaire à la signalisation par cette hormone stéroïdienne [60]. En effet, c'est la concomitance de l'augmentation intracellulaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) avec l'influence progestative qui apparaît comme cruciale dans l'atteinte de la pléthore de modifications expressionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles distinguant la transformation déciduale. Ces mécanismes moléculaires sont résumés schématiquement en figure 1.4.

L'AMPC est un second messenger ubiquitaire généré par la cyclisation de l'adénosine triphosphate (ATP) par l'adénylate cyclase. Cette dernière, située sur la face interne des membranes cellulaires, peut être activée par une multitude de molécules extracellulaires se liant à un récepteur à 7 passages transmembranaires lié à une protéine G cytoplasmique. La cible principale de l'AMPC est la protéine kinase A (PKA),

une enzyme cytosolique centrale du kinome humain. La PKA existe sous forme d'holoenzyme tétramérique constituée de deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques; suivant l'activation de l'adénylate cyclase, l'AMPc nouvellement formée se fixera aux sous-unités régulatrices, libérant de fait les sous-unités catalytiques. Ces dernières auront ensuite la capacité de phosphoryler les cibles cytoplasmiques, comme nucléaires, de la voie PKA, avec en tête de liste la protéine d'attachement aux éléments de réponses à l'AMPc (CREB), l'un des facteurs de transcription le plus fondamentale de la régulation expressionnelle générale. Cette dernière sera accompagnée d'une protéine co-activatrice se liant à CREB (CBP/p300) qui, par son activité d'histone acetyltransferase, permettra la remodelisation de la chromatine et la modulation de l'expression de gènes cibles. Dans le cas des cellules en décidualisation, c'est principalement l'action de la PGE2, générée suivant l'augmentation de l'expression de COX-2 par la progestérone, de l'hCG, de la FSH et la LH qui permettront l'activation primaire de l'adénylate cyclase [61, 62]. Il apparaît certain que l'activité de PKA est nécessaire à l'accomplissement du programme décidual et son inactivation invalide presque entièrement la sensibilité des cellules stromales à l'action de la progestérone [63, 64]. S'ensuivra l'activation de plusieurs voies de signalisation en plus de l'expression de plusieurs facteurs de transcriptions, tel que la CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β), HOXA10 et FOXO1. Ces évènements se produisent de concert avec la translocation nucléaire de l'isoforme A du récepteur à la progestérone (PR-A) qui pourra moduler spécifiquement ses cibles suivant son interaction avec ces facteurs de transcription [65-68]. Il semble donc juste de dire que les mécanismes moléculaires permettant l'accomplissement de la décidualisation dépendent des hormones stéroïdiennes et de l'activation des voies de signalisation dépendantes de l'AMPc et que c'est la convergence de ces deux axes de régulations qui permet l'aboutissement de ce processus transformatif. En somme, c'est l'action concertée de tous ces paramètres qui permet l'expression robuste et soutenue de IGFBP1 et PRL [5, 65]; l'un des facteurs de transcription dont l'implication dans ce processus semble indispensable est Forkhead box protein O1 (FOXO1) [68-70].

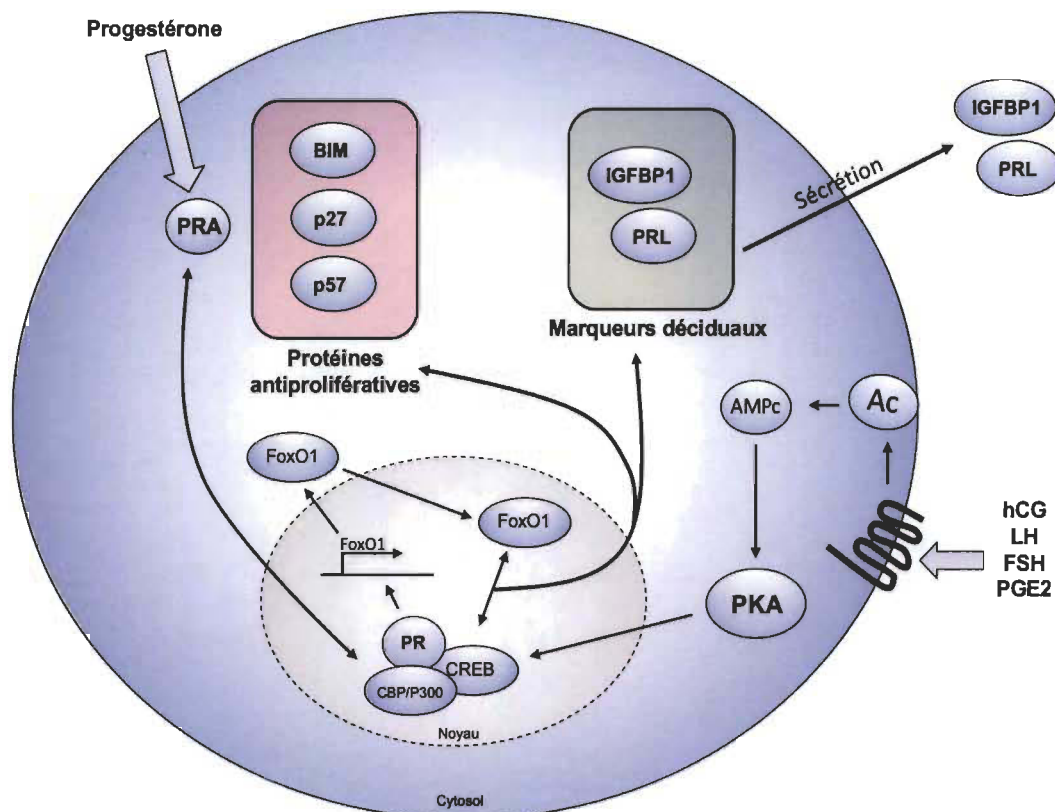


Figure 1.4 Représentation diagrammatique des mécanismes moléculaires sous-jacents à la décidualisation

L'action des récepteurs à sept domaines transmembranaires permet l'activation de l'adenylate cyclase, l'accumulation d'AMPc et l'activation de PKA; cet évènement, de concert avec la localisation nucléaire du récepteur à la progestérone suivant l'entrée au cytosol de cette hormone stéroïdienne, engage un programme transcriptionnel complexe qui permet l'expression de marqueurs déciduaux spécifiques (IGFBP1 et PRL) ainsi que de protéines antiprolifératives (BIM, p27, p57).

La famille des protéines FOXO est constituée de protéines hautement conservées agissant comme facteurs de transcription; cette dernière présente trois principaux membres, à savoir FOXO1, FOXO3a et FOXO4. L'une des spécificités des protéines FOXO tient dans leur capacité à user de leur domaine de liaison à l'ADN forkhead pour simultanément réguler la remodelisation de la chromatine et diriger de façon directe l'expression de ses cibles géniques. Les membres de la famille FOXO divergent donc des facteurs FOXA, se fixant principalement à la chromatine condensée et provoquant son

relâchement, et FOXO, facteurs de transcription capable de recruter plusieurs co-régulateurs et présentant une activité orientée vers la répression transcriptionnelle [71]. Cette capacité de FOXO à moduler l'expression génique par plusieurs mécanismes en fait l'un des facteurs de transcription aux fonctions les plus diverses, affectant la différenciation cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire, le métabolisme et l'apoptose; une section ultérieure de cette thèse sera entièrement consacrée à ce processus de suicide cellulaire programmé. De façon fort intéressante, certaines données permettent de croire que l'interaction entre CBP/p300, cible fonctionnelle cruciale de la voie PKA, serait nécessaire à la pleine activité de FOXO1, le relâchement de la chromatine étant permis par l'activité acétyltransférase de CBP/p300 potentialisant l'activité de FOXO1 et l'acétylation de FOXO1 par CBP/p300 modulant la spécificité des séquences génomiques ciblées par FOXO1; les mécanismes spécifiques permettant cette synergie ne sont toutefois entièrement clarifiés [72, 73]. Dans l'endomètre humain, l'expression de FOXO1 apparaît comme fortement augmentée lors de la décidualisation alors que les niveaux de FOXO3a et FOXO4 semblent réduits ou même abrogés [68, 74]. C'est principalement l'action concertée et soutenue de la progestérone et de PKA qui permet l'expression de FOXO1 lors de la décidualisation [68, 74, 75]; toutefois, de façon très intéressante, FOXO1 semble capable de moduler sa propre expression de façon positive et générant ainsi une boucle d'activation en induisant l'expression de TWIST1, facteur de transcription augmentant lui-même l'expression de FOXO1 [76, 77].

Comme mentionné précédemment, l'expression des marqueurs déciduaux principaux est indissociable de l'activité de FOXO1 [76]; toutefois, l'expression de ces marqueurs ne constitue pas la seule fonction de FOXO1 lors du processus décidual. En effet, c'est aussi en grande partie à travers FOXO1 que la progestérone exerce son effet antiprolifératif. FOXO1 module l'expression de plusieurs protéines régissant la prolifération et le cycle cellulaire tel que p27 et p57, des inhibiteurs des kinases dépendantes aux cyclines (CDKN1B et CDKN1C, respectivement) et Bim, un inhibiteur des protéines de la famille BCL-2 [78, 79]. De ce fait, FOXO1 apparaît comme nécessaire à l'induction de l'apoptose suivant la cessation de l'influence progestative, processus capital dans l'érosion de la couche fonctionnelle endométriale et arrivée des menstruations

[74]. Certaines évidences suggèrent même que l'influence concomitante de l'AMPc et de la progestérone permettrait l'accumulation de FOXO1 par augmentation de sa transcription. Cette augmentation serait accompagnée d'une séquestration cytosolique partielle, qui serait rapidement renversée suivant le retrait de l'influence progestative; s'ensuivrait une rapide translocalisation nucléaire de FOXO1 et l'induction de l'apoptose des cellules stromales endométriales, processus qui pourrait en partie expliquer un mécanisme d'induction des menstruations [74, 80]. Ces observations mettent en évidence la complexité des mécanismes de régulation de FOXO1 permettant, à travers la modulation de sa localisation intracellulaire, un contrôle rhéostatique du destin cellulaire. C'est, évidemment, grâce à la convergence de multiples voies de signalisation qu'émerge ce raffinement signalétique; outre l'influence éminente de la progestérone et de la voie PKA, l'une des voies de signalisation la plus importante régissant la localisation et l'activité de FOXO1 tient dans l'un des axes centraux de la signalisation cellulaire, PI3K/Akt.

1.3 Voie de signalisation PI3K/Akt

La voie de signalisation phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt est l'un des sentiers de signalisation les plus importants retrouvés dans la cellule. Les premières démonstrations de l'existence de PI3K ont été obtenues de façon presque simultanée dans plusieurs laboratoires dans les années 1980 grâce à des résultats suggérant que l'activation de récepteurs aux facteurs de croissance permettait la phosphorylation des phosphatidylinositols (Ptdins), plus spécifiquement la phosphorylation du groupe 3'-hydroxyl, générant une nouvelle espèce de Ptdins, les Ptdins-3,4,5-triphosphates (PIP3) [81, 82]. Cette découverte, parallèlement avec la réalisation que certaines oncoprotéines issues du virus du sarcome de Rous et du virus du polyome régissaient la phosphorylation des Ptdins [83], a jeté les bases d'une des hypothèses de recherche les plus importantes dans le domaine de l'oncologie moléculaire, à savoir que PI3K agirait comme vecteur tumorigène en permettant la transformation oncogénique des cellules humaines, et ce, à travers la production des diverses espèces de Ptdins émergeant de cette activation. Il va s'en dire que les années auront permis d'explorer et de confirmer pleinement cette

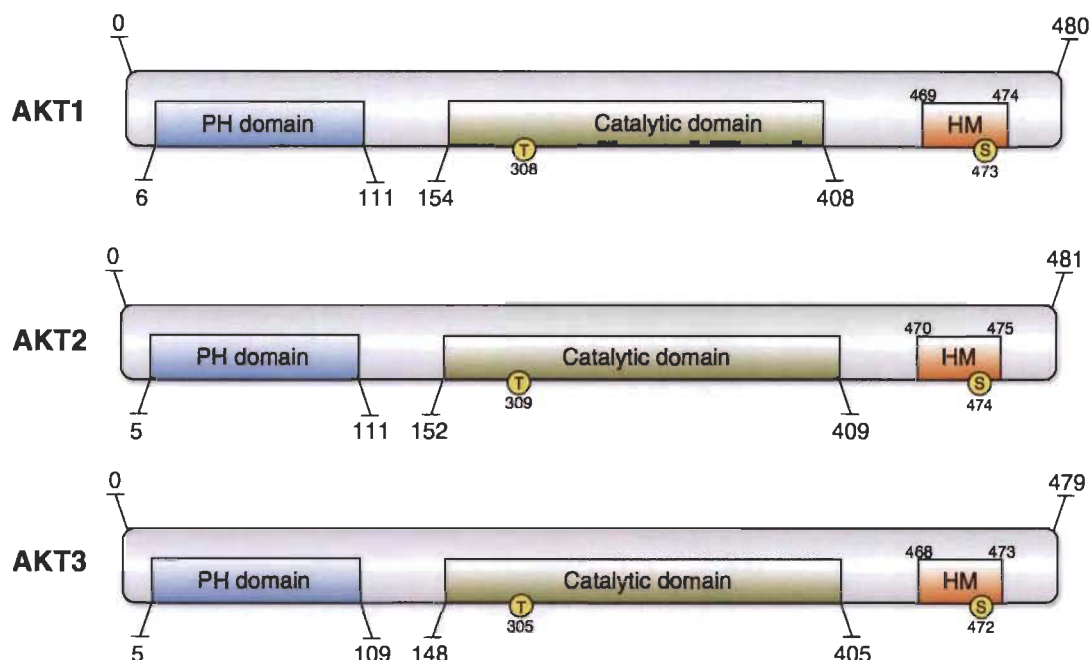
hypothèse, la place de l'axe PI3K/Akt dans les processus de prolifération cellulaire, d'apoptose, de métabolisme et de différenciation faisant maintenant plutôt office de paradigmes que d'hypothèse à proprement parler. Alors que trois grandes classes de PI3K existent, ce sont les membres de la classe I qui retiennent notre attention aujourd'hui de par leurs fonctions dans la réponse cellulaire aux facteurs de croissance ainsi que les liens entre leur activité et les maladies humaines, robustement étudiés dans la littérature actuelle [84]. PI3K existe sous forme d'un dimère obligatoire, formé d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice dont l'identité peut être variée. On retrouve quatre isoformes de p110 (α , β , γ et δ , respectivement encodé par le gène *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG* et *PIK3CD*); par souci de simplicité, nous traiterons principalement de p110 α , associé classiquement à la sous-unité régulatrice p85 α (encodé par le gène *PIK3R1*), forme dimérique classique de la kinase PI3K retrouvée dans les tissus gynécologiques et largement impliquée dans les diverses pathologies qui y sont rattachées [85]. Habituellement, le PIP3 est produit par la phosphorylation du PIP2 par PI3K suivant son amarrage à un récepteur transmembranaire présentant une activité tyrosine kinase ou une GTPase de type Ras. Alors que l'interaction entre PI3K et les phosphotyrosines est rendue possible par la présence d'un domaine homologue à Src (SH2) sur la sous-unité p85 α , c'est plutôt p110 α qui interagit avec les GTPase via son domaine de liaison à Ras (RBD). Cette souplesse quant à l'identité des protéines auxquelles PI3K peut s'amarrer et par lesquelles elle sera subséquentement activée permet à cette voie de signalisation d'opérer l'intégration d'une multitude de stimuli à la fois et fait converger ces derniers vers une réponse cellulaire organisée. Une fois PI3K liée à son récepteur en amont, elle gagne la capacité de recruter et de phosphoryler ses cibles en aval, un recrutement rendu possible par la transformation du PIP2 en PIP3, ce dernier interagissant avec le domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) présent sur la majorité des cibles de PI3K. C'est la phosphatase and tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1 (PTEN) qui s'oppose d'abord à cette action, en déphosphorylant le PIP3 en PIP2 et régulant ainsi négativement l'activité de la voie de signalisation PI3K. Toutefois, en l'absence de cette régulation négative, l'accumulation de PIP3 permettra l'activation quasi universelle de la kinase PDK-1 et Akt; c'est là l'une des voies de signalisation qui sera centrale à notre démarche de recherche.

1.3.1 Histoire de la découverte d'Akt

L'histoire d'Akt commence en 1927, alors qu'un donneur anonyme octroyait une large somme à l'Université de Pennsylvanie [86], dans le but d'élucider une maladie nouvellement décrite, la leucémie. En découla, suivant les travaux d'infection par virus aviaires de Tyzzer et Little, la création par Furth de trois lignées de souris servant à étudier l'apparition de la maladie. La lignée « A », provenant d'un vendeur d'animaux de la Pennsylvanie, semblait avoir une propension faible pour le développement de la leucémie de type lymphoïde; aucune information n'était disponible cependant pour la lignée « S », provenant d'un vendeur d'animaux au New Jersey; finalement, la lignée « R » allait servir de contrôle, la lignée murine provenant de l'institut Rockefeller présentant une longévité supérieure à la normale et ne développant que très rarement des néoplasies. À la suite d'une multitude de croisements et d'unions consanguines, une souche nommée « AKr », dérivée de la souche originelle A, sous-lignée K, sous-lignée R, fut identifiée par Clara J. Lynch comme affligée d'une forte incidence de leucémie. Cette dernière détermina par la suite que le thymus était un organe crucial dans le développement de la maladie, une avancée considérable pour l'époque. S'ensuivit la purification des cellules de thymus et l'isolation d'un rétrovirus, en 1977 [87], capable à lui seul d'induire une transformation oncogénique dans les cellules de vison; ce virus, Akt8, identifié par Staal, tire son nom de la souche **AKR** et de sa faculté de transformation, ou transformation capabilities; le gène fut donc d'abord appelé v-akt, pour viral AK-transforming. De ce virus, premier de l'histoire isolé d'un lymphome murin et capable de transformer une cellule ne provenant pas de la souris, on tira en 1987 une séquence présentant une homologie forte avec un gène humain, qu'on nomma c-Akt, et on en résout les trois isoformes [88-90]. C'est son homologie la protéine kinase A et la protéine kinase C suggère d'abord le nom de PKB, nom aujourd'hui tombé dans la désuétude [91].

1.3.2 Régulation de l'activation d'Akt

La quasi-totalité des tissus et cellules répondent à l'activation de PI3K par une hausse de l'activité d'Akt, une sérine/thréonine kinase appartenant à une famille composée de trois isoformes aujourd'hui appelés Akt1, Akt2 et Akt3 et dont les structures respectives sont illustrées en figure 1.5. Chacune de ces protéines, codées par un gène spécifique, présente une séquence de grande homologie avec les autres isoformes, soulignant la redondance fonctionnelle et structurelle retrouvée entre elles [92]. L'immense majorité des démonstrations retrouvées dans la littérature suggèrent qu'Akt occupe un rôle central dans les processus de survie cellulaire, d'évasion de l'apoptose, de prolifération cellulaire, de différenciation et de régulateur métabolique [37, 85, 93-95]. La forme inactive d'Akt réside généralement au niveau du cytosol et se voit recrutée à la membrane plasmique par la phosphorylation de PIP2 vers PIP3, et ce, via l'activité de PI3K. Plusieurs protéines appartenant à l'axe PI3K/Akt comprennent un domaine PH, tel que IRS1 ou PDK1 [96, 97]; considérant que ce dernier permet le recrutement membranaire et la concentration des acteurs de la voie de signalisation dans une plateforme signalétique cohérente, il apparaît juste de le considérer comme crucial dans l'activation de ce sentier de signalisation. Il semble important de noter que certaines données pointent vers l'aptitude d'Akt à lier le PIP2 tout comme le PIP3, tel que démontré par des études mécanistiques et cristallographiques [98, 99]; l'activation complète d'Akt, toutefois, semble être favorisée suivant sa liaison au PIP3 [100-102]. L'apparition de ce second messager ancré dans le feuillet interne de la membrane lipidique provoquera donc la liaison du domaine PH d'Akt et son activation subséquente par changement conformationnel. Ce changement libérera le site de modification post-traductionnel principal d'Akt, à savoir son site de phosphorylation thréonine (308 sur Akt1, 309 sur Akt2 et 305 sur Akt3).

**Figure 1.5****Structure des isoformes d'Akt**

Représentation schématique des isoformes d'Akt avec l'indication de la localisation de leur domaine PH, de leur domaine catalytique et de leur motif hydrophobique. Les lieux de phosphorylation principaux (T pour thréonine et S pour sérine). RefSeq sur NCBI utilisés: Akt1: NP_001014431.1 Akt2: NP_001617.1, et Akt3 : NP_005456.1. Adapté de Fabi et al. 2014

Le premier acteur de l'activation d'Akt est PDK1, lui-même précédemment recruté à la membrane plasmique par son domaine PH [103, 104]; PDK1, suivant sa localisation nouvellement contiguë avec Akt, phosphorylera ce dernier sur la thréonine présente dans son domaine catalytique [92]. Une seconde phosphorylation, cette fois opérée par le mechanistic Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) sur la sérine c-terminale (S473 pour Akt1, S474 pour Akt2 et S472 pour Akt3) d'Akt permettra son activation complète. Certains auteurs suggèrent que la phosphorylation de la thréonine peut être suffisante pour l'activation d'Akt; toutefois, la double phosphorylation semble nécessaire à la stabilisation de la phosphorylation de la thréonine et, implicitement, le maintien de l'activité d'Akt [105]. La phosphorylation d'Akt peut être constatée jusqu'à deux heures post-stimulation [106]; toutefois, des expériences très récentes suggèrent que la liaison entre le PIP3 et Akt est nécessaire à la stabilité allostérique de ce dernier, exigeant donc la présence de biomembranes aux sites d'activation de la kinases [107]. Ces résultats sont

à l'encontre du dogme depuis longtemps accepté qui affirme qu'Akt serait libéré de la membrane plasmique suivant son activation complète. Toutefois, de plus en plus d'éléments montrent que les biomembranes formant les endosomes, tout comme l'enveloppe nucléaire, contiennent aussi du PIP3 capable d'activer Akt [108]. De ce fait, le modèle d'activation émergeant actuellement comme le plus plausible met en œuvre l'interaction obligatoire du PIP3 avec Akt comme régulateur implicite de la spécificité des substrats de cette kinase, et ce, en instrumentalisant sa colocalisation indispensable avec un feuillet lipidique pour moduler sa localisation. Les principaux substrats d'Akt présentent habituellement un motif consensus R-X-R-X-X-S/T- ϕ (où X indique n'importe quel acide aminé et ϕ un acide aminé doté d'un résidu hydrophobique). Parmi les multiples molécules en aval d'Akt, nous nous concentrerons sur les trois cibles fonctionnelles principales de cette kinase: la famille de facteurs de transcription FOXO, la voie mTOR et finalement la glycogen synthase kinase 3 (GSK3) (Fig. 1.6).

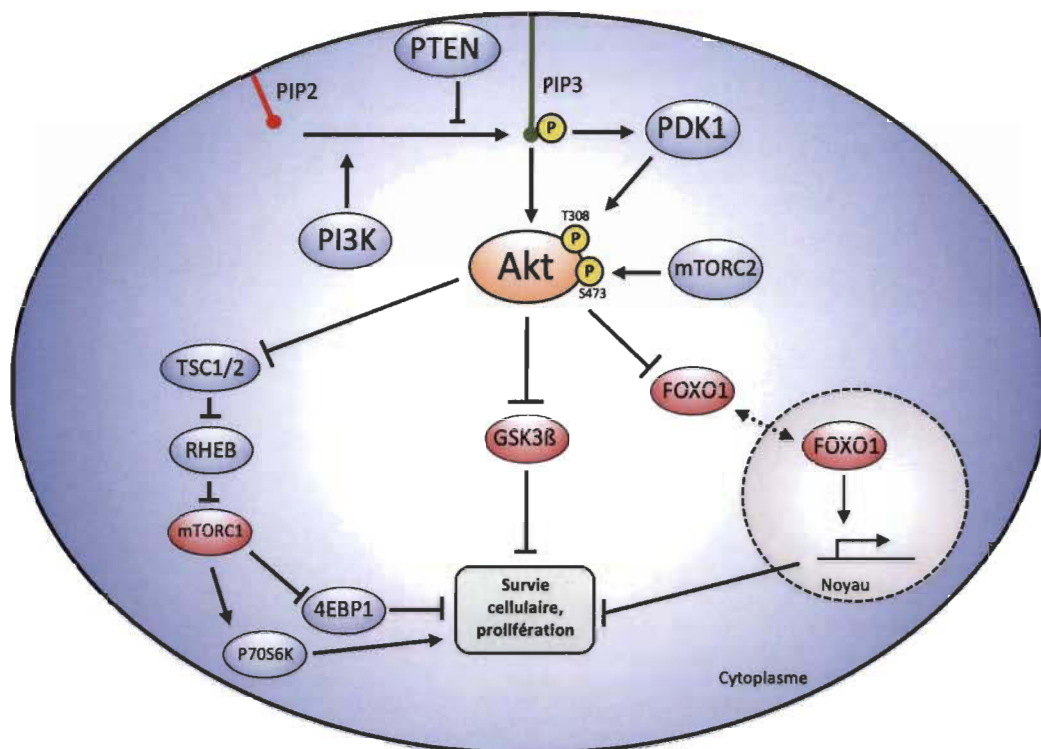


Figure 1.6 Schéma récapitulatif des voies de signalisation contrôlées par Akt. Illustration simplifiée des voies principales en aval de Akt. En orange, la kinase centrale de cette voie, Akt; en rouge, les trois pôles signalétiques principaux expliqués dans cette section.

1.3.3 Régulation de FOXO par Akt

Tel que mentionné précédemment, la famille de facteurs de transcription FOXO est constituée de trois protéines distinctes, nécessitant toute une localisation nucléaire pour accomplir leur fonction de régulation transcriptionnelle. Toutefois, Akt, via la phosphorylation de trois sérines et thréonines hautement conservées, peut endiguer l'importation nucléaire des FOXO; en effet, ces modifications post-traductionnelles permettront la reconnaissance de FOXO par la protéine 14-3-3, engendrant la séquestration cytosolique du facteur de transcription, en plus de stimuler leur exportation nucléaire, un mécanisme médié par l'exportine 1 (CRM1) [109, 110]. Si toutefois sa translocation nucléaire aboutissait, FOXO permettra la transcription de plusieurs gènes contrôlant le destin cellulaire tel que, entre bien d'autres, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), de multiples cyclines ainsi que des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (Cyclin D, Cyclin G2, p21, p27), du récepteur à l'estrogène (ESR1), de

facteurs de transcription (CBP/p300 interacting transactivator 2) et même de FOXO1 et 3 eux-mêmes [111]. Le rôle déterminant de la voie Akt dans la régulation de la localisation d'une classe de facteurs de transcription aussi importants que FOXO souligne particulièrement bien le caractère central et intégratif de la voie PI3K/Akt.

1.3.4 Régulation de GSK3 par Akt

GSK3, pour sa part, est une sérine/thréonine kinase possédant deux isoformes, GSK3 α et GSK3 β , exhibant une homologie de près de 90%. Les deux isoformes possèdent, malgré leur redondance fonctionnelle importante, certaines fonctions spécifiques qui semblent dépendre du contexte tissulaire [112]. Suite à l'induction de l'activité de la voie PI3K/Akt par des facteurs de croissance, on observe l'inhibition de l'activité de GSK3; en effet, en l'absence de phosphorylation par Akt (sur la sérine 21 dans le cas de GSK3 α et sur la sérine 9 dans le cas de GSK3 β), GSK3 est active et pleinement capable de phosphoryler les cibles en aval de sa voie de signalisation. Toutefois, suivant la phosphorylation inhibitrice effectuée par Akt, le phosphate ainsi ajouté diminuera l'accessibilité des substrats de GSK3 à son site catalytique, limitant sa capacité à interagir avec ses substrats. GSK3 est l'une des rares kinases nécessitant une phosphorylation préalable de son substrat pour interagir avec lui, ce qui permet une régulation encore plus serrée de la spécificité de sa phosphorylation [113]. La majorité des cibles de GSK3 appartiennent à des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme, la prolifération cellulaire et le développement tissulaire; l'activité de GSK3 permettra habituellement de limiter la prolifération cellulaire ainsi que la synthèse protéique et glycogénique en plus de favoriser la transcription de gène pro-apoptotiques [112, 114]. Des études *in vivo* ont aussi souligné l'importance particulière de la phosphorylation de GSK3 β dans la réponse à l'insuline [115]. De plus, la phosphorylation de certaines cibles par GSK3, comme l'induced myeloid leukemia cell differentiation protein (MCL-1), une protéine de la famille de Bcl-2 qui inhibe l'induction de l'apoptose, permet sa dégradation spécifique par le protéasome, ce qui implique qu'Akt possède la capacité de stabiliser cette dernière par l'inactivation de GSK3 [116]. Finalement, GSK3

semble présenter la capacité de réguler directement l'activité de la voie PI3K/Akt en favorisant la dégradation de RICTOR, une composante cruciale de mTORC2 [117].

1.3.5 Régulation de la voie mTOR par Akt

La voie mTOR, de son côté, agit comme lieu de confluence de la signalisation cellulaire pro-proliférative et comme un organe sensoriel moléculaire capable de percevoir la disponibilité de nutriments. Deux complexes mTOR distincts sont retrouvés dans la cellule. Tout d'abord, le premier complexe appelé mTORC1 est composé de mTOR, regulatory associated protein of mTOR (Raptor), death domain containing mTOR interacting protein (Deptor), proline rich Akt/PKB substrate protein (PRAS40) et mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8). C'est principalement grâce à cette voie de signalisation que PI3K/Akt peut influencer la biosynthèse protéique et la croissance cellulaire. Suivant l'activation d'Akt, la kinase pourra phosphoryler tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), protéine composant un complexe hétérodimérique avec TSC1 appelé le complexe TSC; ce dernier possède une activité GAP lui permettant d'inhiber la GTPase Rheb en stimulant la catalyse du GTP qui lui est associé en GDP; de ce fait, l'activité d'Akt, par la phosphorylation de TSC2 et l'abrogation de sa fonction GAP, permet la stabilisation du GTP associé à Rheb et l'activation de sa cible, mTORC1 [118]. Une pléthore d'autres stimuli est nécessaire au recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale, site principal de son activité; ces mécanismes ne seront pas explorés, sinon en disant simplement que la présence suffisante d'acides aminés est nécessaire à l'activation complète de mTORC1, assurant ainsi que la synthèse protéique n'a lieu que lorsque les constituantes fondamentales de ces dernières sont disponibles [119]. Par la suite, une fois mTORC1 activé, on observera deux effets directs principaux. Tout d'abord, la phosphorylation de eIF4E binding protein (4EBP1) permettra la déstabilisation du complexe 4EBP1-eIF4E et stimulera la traduction des ARNm coiffés et, ensuite, la phosphorylation activatrice de la p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) sur sa thréonine 389, protéine ayant comme substrat principal la protéine ribosomale S6; cette dernière représente une composante essentielle de la sous-unité ribosomale 40S. Notons que pour être pleinement activée, p70S6K doit aussi être phosphorylée par PDK1 sur la thréonine

229 [120]. En somme, l'activation de mTORC1 permettra d'organiser et de stimuler la machinerie moléculaire nécessaire à la synthèse protéique.

Pour sa part, le deuxième complexe, appelé mTORC2, est constitué de rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR), mammalian stress-activated protein kinase SAPK interacting protein (mSin1), protein observed with RICTOR (Protor), PRAS40 et mLST8. Comme son nom l'indique si aptement, le complexe mTORC2 apparaît comme partiellement résistant à l'effet inhibiteur de la rapamycine, au contraire de mTORC1 qui se voit inactivé par cette molécule. Tel que précédemment expliqué, c'est mTORC2 qui permet la phosphorylation en sérine 473 d'Akt; c'est là le rôle principal de ce complexe protéique. Malheureusement, ce complexe ayant été décrit relativement récemment, beaucoup de travail est encore nécessaire afin de caractériser et de clarifier les mécanismes permettant l'activation de mTORC2. Certaines données, toutefois, permettent d'affirmer que mTORC2 serait stimulée principalement par les voies classiques des récepteurs aux facteurs de croissance; en effet, la présence de PIP3 semble capable de stimuler les fonctions kinases de mTORC2 de façon directe via un domaine PH présent dans mSin1 [121, 122].

Nous avons d'abord décrit brièvement les mécanismes de régulation impliquant Akt et ses voies de signalisation; il convient maintenant, en considérant la multiplicité des processus moléculaires impliqués dans la régulation de la physiologie associés à la biologie gynécologique, de se pencher sur le rôle de la dysfonction de ces mécanismes dans l'émergence de phénomènes pathologiques. Nous nous concentrerons donc, dans la prochaine section, sur les éléments de régulation signalétiques mis en cause au sein de deux problématiques critiques touchant l'appareil reproducteur féminin, à savoir l'infertilité et les cancers gynécologiques.

1.4 L'infertilité

L'infertilité, ou plus précisément la sous-fertilité, représente une problématique dont l'incidence est en constante augmentation en Amérique du Nord. En effet, au Canada, les statistiques rapportent que près de 16% des couples présentent des difficultés de fertilité d'origines diverses. Ce type de problème de santé est particulier dans la mesure où il limite la capacité d'une personne à atteindre un rôle social désirable, à savoir celui de parent, et la démonstration empirique de la fertilité de ce dernier, caractère fondamental et intrinsèque de la construction socialement acceptée d'une personne en bonne santé. C'est principalement l'âge des femmes au moment de la conception qui est mis en cause, âge de plus en plus repoussé compte tenu du délais croissant avant la création de couples, un phénomène découlant possiblement de l'âge plus tardif de la fin des études et l'intérêt maintenant plus prononcé des femmes de poursuivre des carrières. En effet, la proportion de premiers-nés chez des femmes de 35 et plus a passé de 3% en 1984 à 11% en 2008, un bond important et évocateur du changement de mœurs des couples d'aujourd'hui [123]. À la différence des hommes, les femmes naissent avec une réserve gamétique limitée et insubstituable, appelée la réserve ovarienne. Cette dernière, au nombre d'environ 1 millions de follicules à la naissance, diminuera progressivement et inéluctablement au cours de la vie pour atteindre le nombre d'environ 25 000 vers 37 ans; la réduction du nombre de follicules recrutés à chacun des cycles ovariens entraînera une réduction de l'amplitude de la hausse d'estradiol. Ce déficit activera une boucle de rétro-activation occasionnant une production accrue de FSH, avec comme objectif de décupler le nombre de follicules recrutés et, implicitement, le niveau d'estradiol sécrété; à ce moment, l'action de cette hausse croissante de FSH provoquera la perte accélérée des follicules, via un sur-recrutement de ces derniers à chacun des cycles, et l'arrivée éventuelle de la ménopause par déplétion complète de la réserve folliculaire et cessation de la cyclicité hormonale.

Alors qu'une anomalie des facteurs masculins semble présente dans 30% des cas d'infertilité des couples, les facteurs féminins sont responsables de cette même infertilité

dans 35% des cas [124]; toutefois, des facteurs masculins et féminins semblent coexister simultanément dans le couple une fois sur cinq. Même si une multiplicité de phénomènes et maladies sont associés à l'infertilité des femmes en pays industrialisés, on notera spécifiquement la place prédominante des problématiques ovulatoires, en plus secondairement les problématiques menstruelles et les maladies telles que l'endométriose; un nombre plus restreint de femmes seront touchées d'une infertilité inexplicable par quelconques facteurs directs [123, 125, 126]. Plusieurs couples atteints de sous-fertilité feront usage des diverses techniques de la procréation médicalement assistée, palliant aux défauts ovulatoires et de fertilisation. De façon très intéressante, les taux de succès de ces techniques restent modestes même dans certains cas utilisant des embryons de grande qualité, soulignant l'importance des mécanismes régissant l'apparition et le maintien de la fenêtre d'implantation et permettant la nidation efficace de l'embryon [127, 128]. En effet, il semblerait que l'échec de la placentation ainsi qu'une décidualisation anormale soient les deux facteurs les plus importants dans l'infertilité liée à l'âge [129]. Alors que le rôle de la voie PI3K/Akt semble bien compris dans les processus de folliculogénèse et d'ovulation [130], les fonctions de cette voie de signalisation dans l'utérus et dans sa fonction procréative restent largement obscures; les fonctions précises jouées par la voie PI3K/Akt dans la reconnaissance de la grossesse sont, aussi, très peu étudiées. Il est reconnu qu'une communication étroite doit être établie entre l'embryon et l'endomètre afin de permettre le maintien de la grossesse et que ce processus dépend en grande partie des processus déciduaux. Ceux-ci, tel mentionné précédemment, nécessite la transition partielle du phénotype des cellules stromales vers un phénotype épithélial; subséquemment, ces mêmes cellules devront être érodées pour permettre la pénétration des cellules trophoblastiques suivant cette réorganisation tissulaire [131].

1.4.1 L'endométriose

Une multitude d'études ont démontré l'effet délétère majeur de l'endométriose sur la fertilité [132-134]; en effet, de 35% à 50% des cas d'endométriose conduiront à un diagnostic de sous-fertilité. Ces effets sont explicables par l'activation anormale, au sein des explants endométriotiques, de voies pro-inflammatoires, pro-prolifératives et anti-

apoptotiques. L'étiopathologie de l'endométriose n'est pas particulièrement claire. Toutefois, le modèle le plus largement accepté met en cause des cellules endométriotiques implantées généralement dans la cavité péritonéale suivant des menstruations rétrogrades. Les cellules ainsi délocalisées se réenracineront principalement sur les ovaires et sur le péritoine sous forme d'implants endométriotiques [135]; ces derniers proliféreront en suivant le cycle hormonal, surtout en réponse à l'œstrogène. Ces cellules semblent toutefois présenter la capacité de migrer pour recoloniser l'endomètre malgré leur ancrage [136]. L'activation intracellulaire et localisée de voies prolifératives, anti-apoptotiques et pro-inflammatoires dans ces cellules semble induire la dérégulation de la physiologie utérine et ovarienne en recrutant plusieurs types de cellules immunitaires. Ces dernières, répondant à une inflammation localisée, sécréteront une variété impressionnante de cytokines pro-inflammatoires et, parfois, pro-prolifératives, ce qui perturbera le micro-environnement du système reproducteur. Principalement, l'activation de macrophages dans le fluide péritonéal mènera à l'augmentation drastique des niveaux de (TNF α), d'IL-1 et IL-6 [137, 138]. Ces molécules signalétiques auront pour effet principal d'induire l'expression de COX-2, enzyme charnière dans la synthèse de PGE₂ [139]. De façon très intéressante, cette dernière semble capable d'activer Akt via sa phosphorylation; au contraire, l'activation d'Akt induit l'expression de COX-2, et donc, de PGE₂ [140-143]. De surcroît, certaines données suggèrent que la PGE₂ serait capable de diminuer l'activité transcriptionnelle de FOXO et que cette modulation serait dépendante de l'activité d'Akt [144, 145]. Finalement, certaines études soulignent que l'activité de la voie PI3K/Akt compromette la capacité des cellules endométrioïdes à entrer en décidualisation [146]. Ces informations permettent donc de croire que l'activation aberrante d'Akt est un processus délétère pour l'implantation embryonnaire et que le contrôle de cet événement est charnière dans la capacité de l'endomètre à établir un environnement approprié pour la prise en charge du conceptus. Nous nous sommes donc intéressés au rôle d'Akt, et à l'implication distincte de chacun de ses isoformes, dans le processus de décidualisation afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes permettant à cette voie de signalisation de régir le processus d'implantation embryonnaire.

1.5 Le cancer

Le cancer, dans sa forme la plus distillée et dans le contexte de la théorie de l'apparition stochastique, apparaît par l'accumulation subséquente de mutations ponctuelles menant à l'émergence de processus anormaux au sein de la cellule (Fig. 1.7). Ces processus, lorsque suffisamment nombreux, mènent à la dysfonction complète des mécanismes moléculaires permettant la régulation cellulaire et conduisent à la formation de cellules rebelles, néfastes pour l'organisme qu'elles constituent.

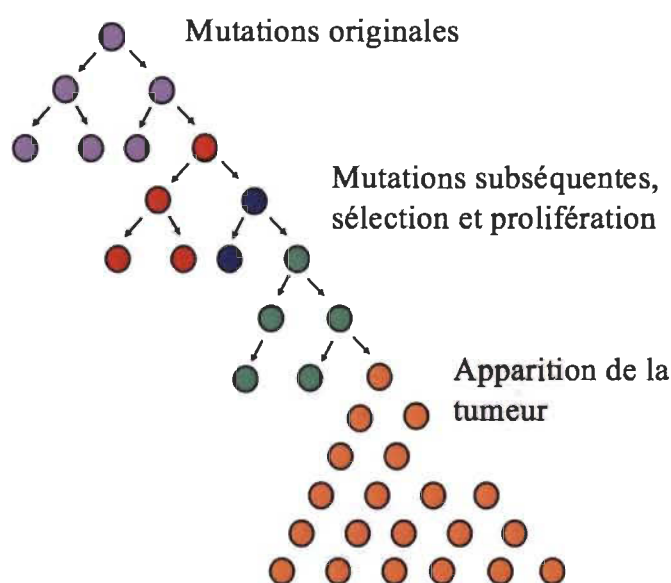


Figure 1.7 **Modèle stochastique de l'émergence tumorale**

Cette sélection clonale rappelle étrangement, sous une forme perversie, les processus évolutifs permettant la sélection de caractères positifs pour la survie d'une espèce, ne serait-ce que dans le cas des cancers, la courte durée de vie des cellules et la multiplicité de leur progéniture permet une accélération exceptionnelle de ce processus de sélection. De la même façon que seuls les individus d'une espèce animale seraient sélectionnés pour se reproduire par des facteurs environnementaux réduisant leur fitness, la cellule cancéreuse tentera d'échapper aux mécanismes de contrôle intrinsèquement imbriqués dans la machinerie cellulaire. Tout comme une espèce invasive qui, faute de prédation,

ravage son écosystème au point de provoquer sa chute démographique, les cellules cancéreuses formant des populations clonales échapperont au système immunitaire et à la pression antiproliférative de leurs consœurs. Par la suite, elles nécessiteront suffisamment de ressources pour éventuellement enrayer complètement le bon fonctionnement de leur écosystème propre, à savoir le corps humain.

Au Canada, environ 43% des gens seront atteints d'un cancer au cours de leur vie et c'est cette maladie qui est responsable de près de 30% des décès annuels observés dans notre société. Contrairement à l'image populaire, le cancer n'est pas une maladie singulière mais plutôt un kaléidoscope de maladies distinctes regroupées sous une même bannière biologique; fondamentalement, on peut caractériser le cancer par l'invariable implication de cellules s'étant soustraites au contrôle de l'organisme, proliférant de façon néfaste et chaotique. La disparité des tumeurs n'a d'égale que celle des patients; élucider les mécanismes associés au cancer relève donc du tour de force, considérant la pluralité quasi-infinie des mutations donnant naissance aux néoplasies. Il apparaît important de mentionner que la cause principale de l'apparition des cancers tient dans l'âge du patient; malgré tout, le cancer reste la maladie affichant la réduction la plus significative des années potentielles de vie perdues, et implicitement, l'espérance de vie globale des Canadiens. De plus, ces statistiques ne cesseront de s'accroître compte tenu du vieillissement populationnel quasi-inéluctable. En effet, une augmentation de près de 80% des nouveaux cas de cancers est prévue d'ici 2028-2032, ce qui représente un fardeau financier et social exceptionnel [147] (Fig. 1.8).

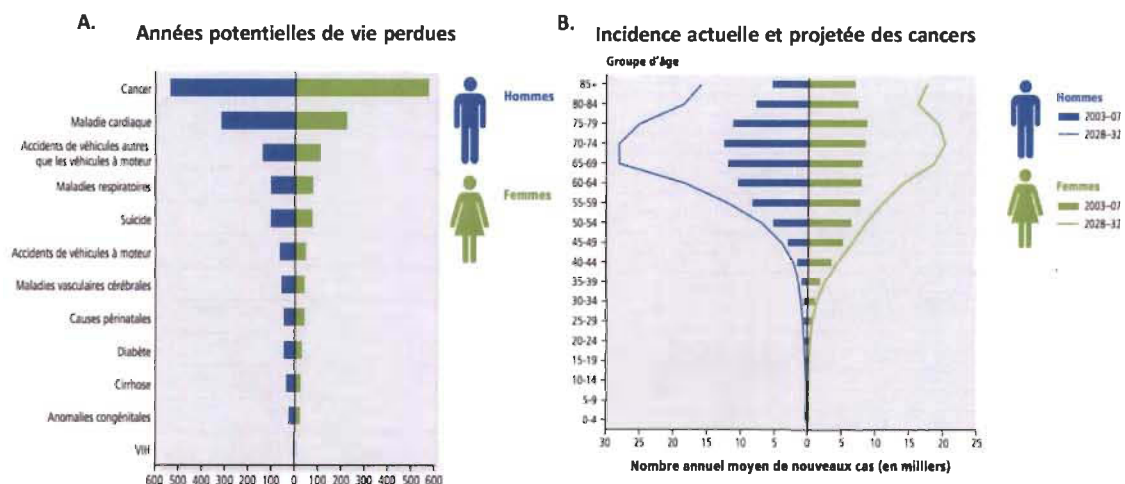


Figure 1.8 Statistiques sur le cancer au Canada
 (A) Années potentielles de vies perdues en fonction des maladies et du sexe. (B) Incidence actuelle et projetée de tous les cancers en milliers d'habitants, en fonction du sexe. (Adaptée de Société Canadienne du Cancer, Statistiques 2015)

Chez les femmes, spécifiquement, ce sont les cancers gynécologiques qui retiennent le plus notre attention. Les cancers gynécologiques, à savoir ovariens, utérins et du sein, représentent dans l'ensemble environ 10% des décès liés aux cancers féminins [147]. Ce sont principalement sur les cancers ovariens et endométriaux que notre intérêt se portera dans le présent ouvrage.

1.5.1 La progression oncogénique

La carcinogenèse est un processus pouvant être expliqué par plusieurs cadres théoriques différents. Depuis plus de 50 ans, le modèle explicatif principal de la carcinogenèse tient dans la théorie de la mutation somatique, modèle cité plus haut. Notons deux modèles alternatifs, à savoir celui des modèles inflammatoires et celui de la théorie des champs organisationnel (tissue organization field theory; TOFT). Le premier décrit le cancer comme une maladie d'origine inflammatoire, et est donc non-mutuellement exclusif avec le modèle somatique; le deuxième, choquant et qui suscite une réflexion profonde sur notre conception de la tumorigénèse, stipule que, au contraire de l'état normal quiescent des cellules, affirmée par la théorie somatique, l'état prolifératif implicite des cellules somatiques serait une fausse prémisse. En effet, la TOFT propose

plutôt que l'état naturel de la cellule en est un prolifératif et que la carcinogenèse survient selon les mêmes préceptes que l'organogenèse, suivant une programmation délétère pour l'organisme mais normale dans le contexte morphogénétique de l'apparition d'un tissu. L'émergence d'une tumeur ne serait donc le fruit que d'une interaction dérégulée entre les divers tissus qui, normalement, devraient contrôler et diriger cette prolifération et différenciation; le cancer ne serait donc pas une maladie génétique mais bien une maladie fruit d'une désorganisation du programme morphogénétique. Mimer cette même interdépendance entre le tissu normal et cancéreux serait donc absolument nécessaire à la compréhension des phénomènes sous-jacents à la tumorigénèse, un concept confirmé par l'utilisation des cultures tridimensionnelles et l'utilisation de modèles expérimentaux ayant récemment réaffirmé et cimenté l'importance exceptionnelle que revêt le micro-environnement tumoral dans la dynamique d'émergence oncogénique. Ces questions soulèvent donc des remises en question fondamentales sur la pertinence des modèles cellulaires, et l'apparition de cancers dans les lignées épithéliales suivant l'incidence de mutations pilotes (driver mutations) et de mutations passagères (passenger mutations) ; notons finalement qu'un argument valide peut être fait à l'égard que le TOFT et le modèle somatique ne sont pas entièrement exclusif, particulièrement en vue des modèles somatiques impliquant les cellules cancéreuses souches, et que ces deux modèles décrivent en fait une paire de phénomènes distincts, mais cohérents, de l'apparition tumorale [148-151].

Notre recherche s'inscrit toutefois, tel qu'indiqué précédemment, dans le contexte du modèle somatique de l'apparition du cancer. Dans ce dernier, le cancer pourrait être considéré comme une maladie génétique, au cours de laquelle les structures biologiques complexes émergent d'une planification fondamentale sous la forme de gènes contenus dans l'ADN. Alors que l'organisme utilise à bon escient cet assemblage d'instructions, des erreurs, provoquées ou implicites, dans les plans donneront naissance à des structures défectueuses, incapables d'accomplir leur fonction primaire et mettant en péril d'autres mécanismes s'appuyant sur ces mêmes fonctions; on dénote donc deux types de mutations, à savoir celles héréditaires et intrinsèques et celles provoquées par les variables environnementales, évidemment extrinsèques. Émergentes de ces mutations sont les deux

composantes principales de ce modèle, les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs, protéines à fonction spécifiques dans le contrôle du destin cellulaire.

Dans un premier temps, les oncogènes sont généralement des protéines possédant une activité pro-proliférative; lorsque les gènes codants pour leurs séquences d'acides aminés sont mutés, les protéines ainsi produites seront altérées et leur fonction s'en verra modifiée. Il est possible que l'expression de cette protéine modifiée entrave les mécanismes de régulation cellulaire endogènes ou que cette même protéine soit soustraite à ces mécanismes; dans les deux cas, on assistera généralement à un gain de fonction de la protéine et/ou au niveau de ses cibles en aval; ce concept de gain de fonction est crucial dans l'apparition de tumeurs. S'ensuivra une suractivation de certaines voies responsable de la survie et de la prolifération cellulaire et la croissance anarchique des cellules filles. L'autre possibilité, à savoir la mutation au sein de gènes codants pour des suppresseurs de tumeurs, vient plutôt saboter des mécanismes de régulation négatifs qui devraient, normalement, s'assurer de permettre la préservation de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Dans ce cas, ce sera plutôt une mutation provoquant la perte de fonction de la protéine suppresseuse de tumeur qui provoquera le déséquilibre signalétique. Il est important de noter que ces deux types de mutations existent généralement parallèlement au sein d'une cellule cancéreuse et que c'est l'accumulation de ces diverses altérations qui prodiguera à une tumeur ses caractères précis tels que sa résistance aux agents chimiothérapeutiques, sa vitesse de croissance, sa sensibilité aux hormones et sa capacité à se délocaliser [152-158]. Au final, le modèle dominant actuel tient dans les dix capacités distinctives du cancer (hallmarks of cancer) souligné et ventilé par Weinberg dans son article phare de 2011 [152] (Fig. 1.9).

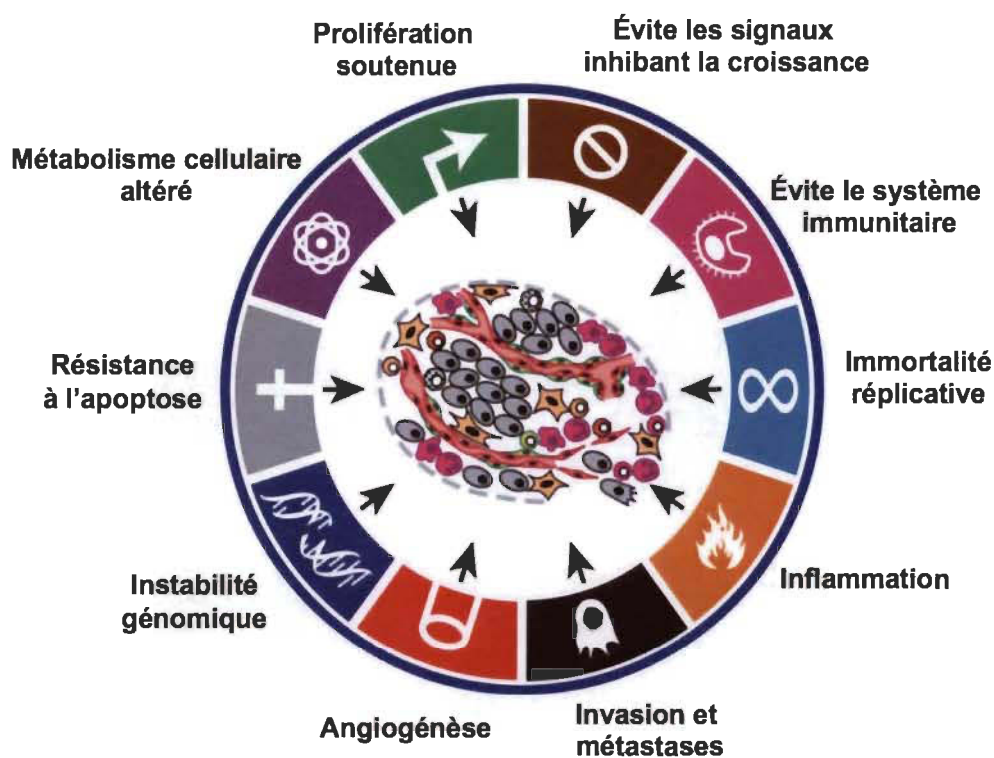


Figure 1.9 Capacités distinctives du cancer
(Adapté de Weinberg 2011.)

Il est accepté que la première mutation importante subit pas une cellule touche généralement une protéine en amont d'une voie de signalisation cruciale de la cellule ou une protéine responsable de l'intégrité génétique de cette dernière; cette mutation, appelée pilote, doit conférer un avantage prolifératif à la cellule. On retrouve, parmi ces mutations pilotes classiques, des modifications sur des gènes tel que APC et BRCA1/2, respectivement responsable de cancers familiaux du côlon et de l'ovaire/sein [158-162]; notons que l'incidence de mutations sur ces gènes n'est pas limitée au contexte héréditaire mais qu'ils sont simplement un bon exemple de ce type de mode de transmission. D'un autre côté, des mutations d'origine habituellement environnementales sont remarquées plus régulièrement dans les gènes p53, KRAS, PI3K et PTEN, gènes qui sont largement surreprésentés dans l'éventail total de mutations pilotes possibles [163-166]. La fréquence exceptionnelle de mutations dans ces protéines retient particulièrement l'attention; de plus, les chercheurs démontrent avec brio que les divers types de cancers sont hétérogènes dans la proportion de mutations affectant les supresseurs de tumeurs et les oncogènes,

certains présentant 75% de leurs mutations pilotes sous forme de gain de fonction dans des oncogènes alors que l'apparition d'autres types tumoraux sont entièrement dépendants de mutations dans les suppresseurs de tumeurs [163]. La première mutation pilote, généralement, octroiera un avantage prolifératif permettant aux cellules la possédant de croître plus rapidement que leurs homologues non-mutées. Cette croissance accélérée produira une population clonale de cellules touchées de la même mutation; cette dernière, toutefois, n'est pas suffisante et c'est l'arrivée d'une seconde mutation qui permettra la sélection d'une population clonale encore plus active proliférativement et l'avènement d'une tumeur à proprement parler. Les mutations subséquentes auront un effet semblable, générant une pression sélective envers une population cellulaire au potentiel de multiplication et d'instabilité génétique accru et au caractère invasif de plus en plus robuste, pénétrant la lame basale; c'est là l'avènement du cancer à proprement parler. Ce dernier pourra finalement se délocaliser de son site de croissance initial pour se loger ailleurs dans le corps, une migration rendue possible en partie par l'EMT, qui prêterait des caractéristiques motiles et pénétrantes aux cellules jusqu'alors circonscrites dans une zone limitée; ces cancers métastatiques sont, bien sûr, les plus mortels.

À titre d'exemple, la séquence de mutations permettant l'apparition d'une tumeur capable de générer des métastases a été bien étudiée dans le cas du cancer colorectal, une maladie à incidence très élevée et ayant un caractère héréditaire important. La mutation pilotes primaire de ce type de cancer se retrouve sur APC, un régulateur négatif du facteur de transcription β -catenin, permettant l'expression anormale de plusieurs facteurs pro-prolifératifs au sein de la cellule [167]. Toutefois, cette mutation est insuffisante et ne permet l'apparition que de polypes bénins. C'est une mutation subséquente dans le gène de KRAS qui forcera l'apparition d'un adénome via l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt, les cellules s'étant presque entièrement soustraites à l'influence antiproliférative de l'absence de facteurs de croissance [168]. C'est la mutation dans les gènes SMAD, cibles majeures de la voie du TGF- β , de concert avec la suractivation de PI3K/Akt qui permettra la transformation cellulaire par EMT [169, 170]. Le processus se soldera par la mutation dans p53, permettant une instabilité génomique importante et

achevant de façonner une tumeur agressive, composée d'une multitude de cellules arborant ce canevas mutationnel [171] (Fig. 1.10).

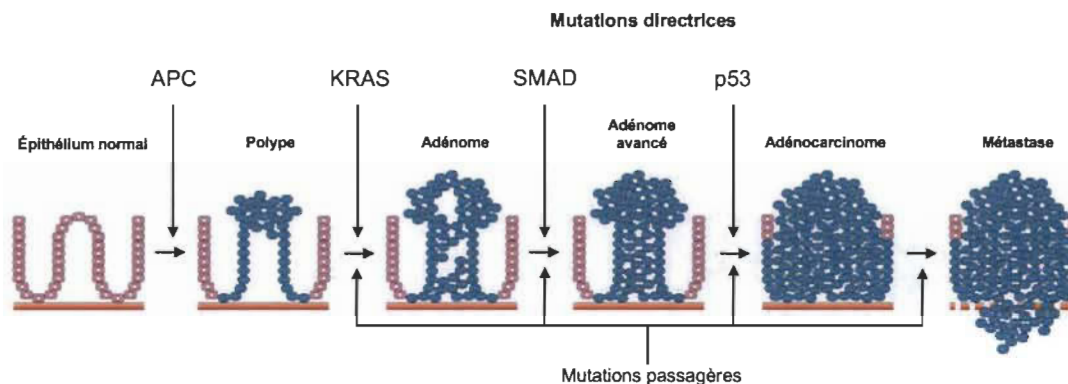


Figure 1.10 Rôle et séquence d'incidence des mutations pilotes dans la progression tumorale

La progression tumorale s'amorce généralement par l'apparition d'une hyperplasie, une surprolifération bénigne d'un groupe cellulaire distinct; ce groupe de cellules possédera généralement la première mutation pilote nécessaire au processus d'oncogénèse. Au fil du temps, la tumeur accumule plusieurs mutations additionnelles lui permettant d'échapper au contrôle des mécanismes de régulation. Finalement, la tumeur gagnera la capacité de franchir la lame basale et de s'insérer dans la circulation sanguine, faculté qui lui octroiera le pouvoir de produire des métastases, un processus rendu possible en grande partie par l'EMT. (Adaptée de Walther A. et al. 2009)

L'acquisition d'une mutation pilote unique ne suffit toutefois pas à l'émergence d'un cancer à proprement parler. En effet, c'est l'accumulation de mutations, et l'incapacité de la cellule à répondre adéquatement à cette instabilité génomique, qui permettra l'apparition d'une tumeur. Les informations les plus récentes suggèrent que de 5 à 8 mutations pilotes sont nécessaires afin qu'on observe un développement tumoral [166]; ce nombre est largement éclipsé, toutefois, par la quantité exceptionnelle de mutations passagères, n'octroyant pas d'avantage sélectif à première vue, pouvant être retrouvées dans le génome d'une tumeur mature. En moyenne, les tumeurs solides présenteront de 33 à 66 mutations géniques provoquant des altérations protéiques alors que seulement 3 à 6 de ces mutations seraient prédites comme étant pilotes [165]. Malheureusement, de par les limitations techniques des méthodologies employées

actuellement, il semble presque impossible de déterminer avec certitude les mutations exactes permettant l'apparition, le maintien et la diffusion d'un cancer spécifique. Notre meilleure approche pour l'instant est l'analyse de fréquence et de prédiction fonctionnelle par bio-informatique, mais cette approche permet d'obtenir des réponses principalement corrélatives, sans déterminer de causation possible et valide. Qui plus est, ces mutations secondaires, émergentes de l'instabilité génomique croissante, permettra l'apparition de sous population clonale provoquant une augmentation de l'hétérogénéité au sein même de la tumeur. Le modèle évolutif linéaire semble, en effet, de moins en valable pour expliquer la propagation tumorale au cours des stades d'extension tumorale ce qui occasionne une hétérogénéité autant spatiale que temporelle (Fig. 1.11). De plus, l'immense majorité des études montre que l'augmentation de l'hétérogénéité tumorale influe négativement le pronostique et l'efficacité des agents chimiothérapeutiques [172].

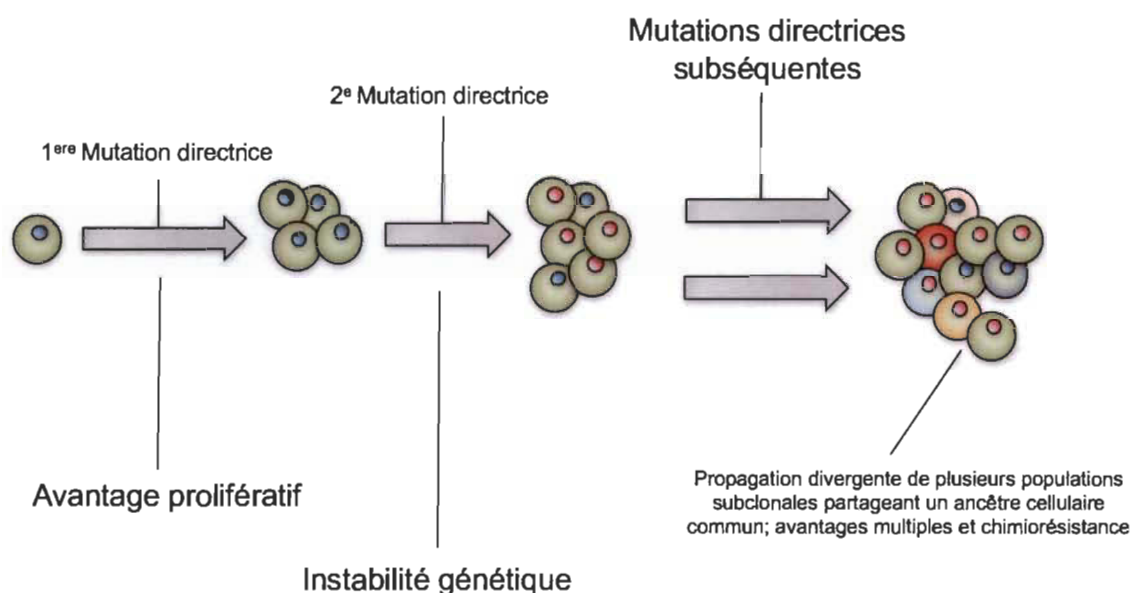


Figure 1.11 **Modèle arborescent de l'apparition des populations cellulaires cancéreuses**

De ces observations, il est possible de d'extraire une hypothèse importante et à fondamentale à cette thèse : frapper la population tumorale, hétérogène et complexe, de plusieurs assauts convergents permettra possiblement d'éluder les mécanismes défensifs issus de l'intrication naturelle des tumeurs. L'utilisation d'agents chimiothérapeutiques uniques ne permettant pas d'agir avec cette largesse thérapeutique et fonctionnelle, il est juste de penser que les thérapies combinées semble une avenue prometteuse dans la lutte

contre les néoplasies. De plus, la charge mutationnelle des tumeurs et l'hétérogénéité retrouvée au sein de ces dernières rendent l'utilisation de thérapies entièrement personnalisées peu vraisemblable sur un horizon temporel de moyen terme. Finalement, l'incidence importante et dominante des mutations touchant la voie PI3K et p53 dans tous les types de cancers souligne particulièrement bien la place charnière de ces dernières dans les processus d'apparition des cancers et permettent de croire que des stratégies interagissant avec ces voies représenteraient une tactique valable et présentant une robustesse thérapeutique potentiellement appréciable.

Au final, l'atteinte de cette mixité cellulaire dans une tumeur distante représente le défi le plus important dans le traitement des cancers. En effet, les cancers métastatiques sont, de façon exceptionnellement écrasante, plus mortels que leurs homologues localisés. Toutefois, les tumeurs primaires étant généralement d'origine épithéliale, des modifications profondes dans les phénotypes des cellules les composant sont nécessaires afin de pouvoir se détacher de leurs tissus d'origine, de se mouvoir, de se délocaliser et de se relocaliser. Le principal processus permettant ce changement paradigmatique est l'EMT, un mécanisme de reprogrammation aux rôles multiples, autant physiologiques que pathologiques.

1.5.2 La transition épithéliale-mésenchymale

L'EMT a d'abord été décrit comme un des mécanismes morphogénétique physiologique nécessaire à l'accomplissement d'une multitude de processus non-pathologiques [173]. Ce processus, malheureusement, est usurpé dans les tissus tumoraux et l'EMT est un facteur déterminant dans le pronostic négatif des patientes atteintes de cancers endométriaux et ovariens [174, 175]. Tel qu'indiqué précédemment, la majorité des néoplasies humaines originent dans les tissus épithéliaux; c'est le cas des cancers endométriaux et ovariens, et ce, nonobstant la théorie d'origine tubaire des cancers séreux ovariens, qui stipule que les cancers séreux ne proviendraient pas de cellules de l'épithélium de la surface ovarienne s'étant dédifférenciées mais bien de cellules des trompes de fallopes [176]. La nature invasive de chaque cancer dépend principalement

de l'accession à un phénotype migratoire par les cellules épithéliales, un phénomène permis par l'EMT [177]; ce dernier constitue un complexe processus au cours duquel les cellules épithéliales acquerront, par reprogrammation transcriptionnelle, une morphologie allongée de type fibroblastique, modifieront leurs protéines d'amarrages, gagneront des capacités migratoires et résisteront aux thérapies cytotoxiques [178, 179]. Les ligands TGF- β ont été identifiés comme des inducteurs robustes de ce phénomène et sont des protéines impliquées dans la carcinogenèse et la dissémination tumorale [180, 181]. Ces derniers sont sécrétés par une multitude de types de cellules et stimulent la production de la matrice extracellulaire et autre molécule microenvironnementale dans les contextes physiologiques ainsi que pathologique [182-184]. Toutefois, alors que le TGF- β agit initialement comme un inhibiteur de la prolifération, les tumeurs de stade plus avancé répondront au TGF- β en décuplant leur motilité et leur potentiel invasif [185-187]. Les mécanismes expliquant ce changement drastique de la réponse cellulaire à ce ligand restent encore aujourd'hui le sujet d'une multitude d'études; de façon fort intéressante, la réactivation de certaines fonctions du programme morphogénétique par l'EMT et sa nécessité presque absolue pour permettre la métastase est l'un des arguments en faveur du modèle TOFT [188].

L'EMT est caractérisable moléculairement par la répression de protéines d'arrimages épithéliales telle que la E-cadhérine, une ancre moléculaire qui permet la cohésion tissulaire et l'attachement aux cellules voisines [189]; cette perte se fera souvent au profit d'une cadhérine mésenchymale, la N-cadhérine, dont l'expression augmentée est liée à un phénotype cellulaire plus invasif [179, 189]. On constatera aussi la perte des Claudines, protéines servant à former les jonctions serrées [190]. Une activation de la polymérisation actinaire, couplée à une perte de polarité apico-basale partiellement induite par la remodelisation du système de filaments intermédiaires et l'expression de vimentine, permettra à la cellule de se mouvoir [191, 192]. Finalement, l'expression décuplée des métalloprotéinases matricielles donnera aux cellules la capacité de dégrader la lame basale et de s'immiscer dans la circulation sanguine [193]. Ce changement de l'identité cellulaire est rendu possible par la stimulation par le TGF- β . Les effets de cette cytokine pléiotropique sont médiés par trois ligands principaux, à TGF- β 1, - β 2, and - β 3. Suivant la

liaison de leurs ligands, les récepteurs au TGF- β de type I and II formeront un complexe hétéromérique qui permettra le recrutement cytoplasmique de Smad2 et Smad3 ainsi que leur phosphorylation [194]. Ces dernières s'associeront à Smad4 et le complexe sera transporté au noyau afin d'accomplir ses desseins transcriptionnels, permettant notamment l'expression de plusieurs facteurs de transcription transformatifs qui orchestreront cette reprogrammation [155, 195]. Les mieux caractérisés sont Snail1-2, ZEB1-2 et Twist et leur expression aberrante est responsable de plusieurs caractéristiques des cancers délocalisés et hautement résistants à la thérapie [188, 196]. Alors que notre attention est portée principalement sur le rôle prédominant du TGF- β , c'est la convergence de plusieurs voies de signalisation qui permet l'accomplissement du programme d'EMT. De façon très intéressante, l'activation de la voie PI3K/Akt permet la stabilisation de Snail1 via l'inactivation de GSK3 β ainsi que par l'activation de la voie de NF- κ B; incidemment, le TGF- β semble aussi capable, dans les cellules ayant déjà progressé partiellement dans le programme d'EMT, d'activer la voie PI3K, formant une boucle de rétroactivation positive [155]. L'activité d'Akt semble aussi corrélée positivement avec les niveaux de Twist et pourrait surmonter l'effet propapoptotique de p53, favorisant la survie cellulaire [197]. La voie NF- κ B, induite par PI3K/Akt par son activation de IKK, semble aussi capable d'induire des changements de type EMT; certaines données suggèrent même qu'une activation soutenue de NF- κ B serait suffisante pour induire l'EMT même en l'absence de signalisation de type TGF- β [198-200]; considérant la suractivation généralisée des voies PI3K/Akt dans les cancers, l'activation complémentaire de la voie TGF- β dans une cellule présentant une voie NF- κ B déjà stimulée pourrait partiellement expliquer la dichotomie fonctionnelle observée dans l'effet du TGF- β sur les cellules normales et transformées par une forme de synergisation délétère des deux voies. Finalement, l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K abroge la capacité du TGF- β à induire l'EMT, soulignant encore une fois le rôle clé de cet axe signalétique dans la transformation cellulaire oncogénique [201].

1.5.3 Le cancer ovarien

Le cancer ovarien occupe la première place de taux de mortalité liées aux cancers gynécologiques, affichant un taux de survie sur 10 ans inférieur à 30% suivant le diagnostique [202]. Le taux de survie très faible associé à cette pathologie peut être expliqué par le diagnostic tardif de la maladie, cette dernière étant majoritairement asymptomatique lors des stades initiaux et moyens. Malheureusement, malgré les efforts déployés par la communauté scientifique, le pronostic de la maladie reste sensiblement le même depuis maintenant près de 30 ans. Deux sous-types principaux de cancers ovariens, aptement nommés type I et type II, sont identifiés. Le type I réunit les cancers originant de cellules germinales ou endométrioïdes, ces dernières provenant généralement de colonisation ectopique de cellules endométriales liées à l'endométriose. Toutefois, la majorité des cancers ovariens, à hauteur d'environ 75%, sont de type II, une classe composée de cancers séreux de haut-grade (high-grade serous ovarian carcinoma; HGSOC) [203, 204]. L'une des avancées les plus majeures des dernières années, rendue possible par les techniques de séquençage à haut débit, tient dans l'identification de l'origine tissulaire des tumeurs ovariennes. En effet, la théorie dominante des dernières décennies a proclamé l'origine épithéliale des tumeurs ovariennes de type II, issues de l'érosion cyclique de l'épithélium de la surface ovarienne pris d'assaut par l'éjection répétée de follicule à travers le cycle menstruel. C'est en 2003 qu'émergea l'idée d'une origine fallopienne des cancers ovariens de haut grade grâce à l'observation que des patientes présentant des lésions dans les tubes utérins ressemblants à des tumeurs séreuses de haut grade et que ces cancers originaient donc possiblement de ce tissu [161]. La validité de ce modèle a été récemment confirmée par plusieurs analyses évolutionnistes utilisant des marqueurs de progression mutationnelle pseudo-longitudinaux et qui ont démontré l'origine fallopienne des tumeurs de type haut-grade séreuses [205-207]. Les cancers de type I sont généralement détectés plus tôt, progressent lentement, répondent adéquatement aux traitements (à l'exception des carcinomes à cellules claires), présentent une certaine stabilité génomique et sont généralement circonscrits à l'intérieur de l'ovaire au moment du diagnostic. Les cancers de type II, pour leur part, sont agressifs, diagnostiqués tardivement, possèdent un génome hautement instable, ces derniers étant

moléculairement caractérisés par des mutations dans le suppresseur de tumeur p53 [207-210]. Malheureusement, étant donné la localisation intrapéritonéale des cancers ovariens sériques, les tumeurs sont capables de créer des métastases distantes sans même devoir pénétrer le système sanguin, une situation qui décuple le potentiel métastatique de ce type de cancer. Qui plus est, les cancers de haut-grades présentent souvent une résistance robuste aux traitements chimiothérapeutiques, freinant notre capacité à combattre efficacement ces pathologies [211, 212]. Des mutations dans le gène de p53, un suppresseur de tumeur central au programme de réponse proapoptotique aux stress génotoxiques, est l'une des caractéristiques génétiques la plus importante de ce type de cancer [172, 213, 214]. Toutefois, un large pourcentage de cancers étudiés par l'Atlas du Génome du Cancer (The Cancer Genome Atlas; TCGA) montrent des amplifications du nombre de copies de gènes de la voie PI3K/Akt dans leur génome (Fig. 1.12). Ce type d'augmentation ne modifie pas la fonction des protéines codées par le gène, comme dans le cas d'un gain ou d'une perte de fonction mais permet plutôt une expression haussée des gènes associés; le phénomène est largement attribuable à l'instabilité génétique importante de ce type de cancers et est un facteur important dans l'établissement de la chimiorésistance [215, 216].

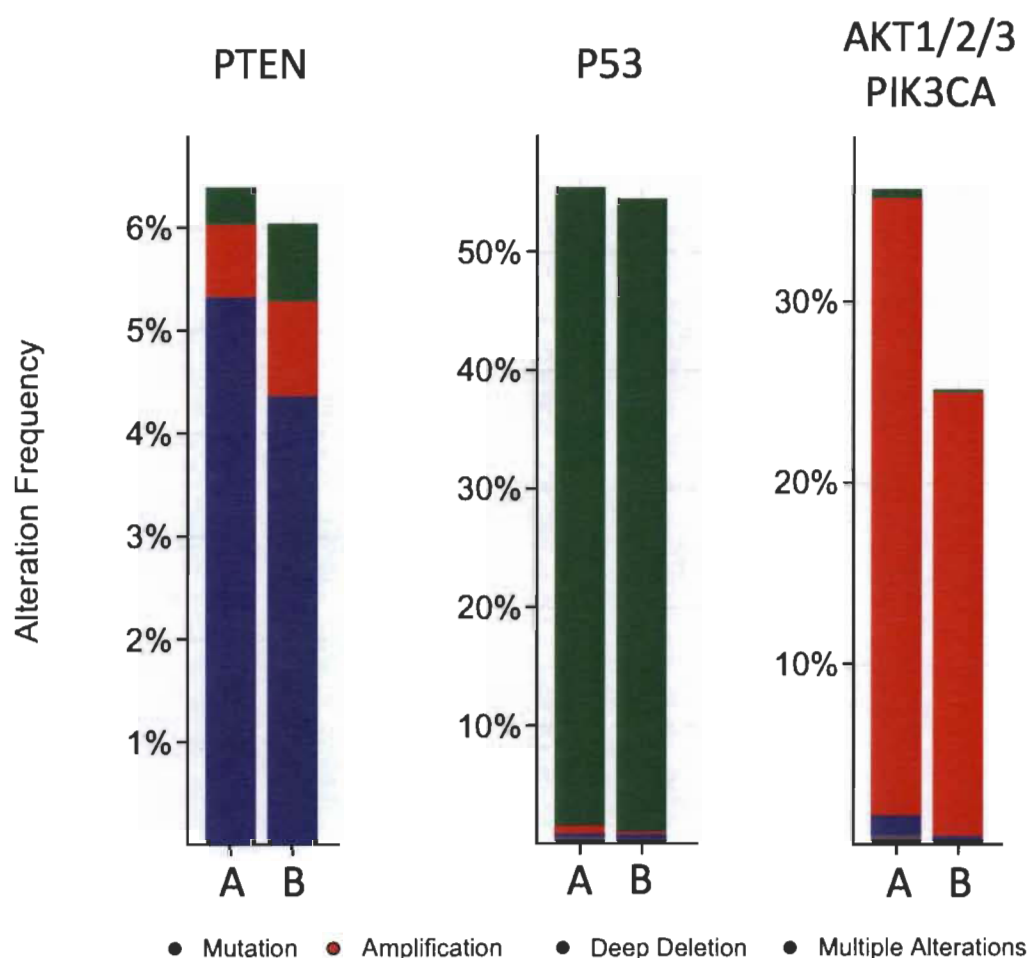


Figure 1.12

Mutations répertoriées dans les cancers ovariens

Ces résultats de séquençages à haut débit montrent le pourcentage de mutations, de délétions, d'amplification et de mutations multiples retrouvées sur les gènes indiqués dans les tumeurs ovariennes de deux types distincts, à savoir (A) les tumeurs séreuses de haut grade et (B) les tumeurs séreuses de bas grade. Les données sont tirées de la base de donnée de The Cancer Genome Atlas et incluent 4 études regroupant 1766 tumeurs analysées.
(Adapté de TCGA)

1.5.4 Le cancer endométrial

Plusieurs types de tumeurs différents peuvent se développer dans l'utérus. Toutefois, notre attention se porte principalement sur le cancer endométrial étant donné l'incidence écrasante de cette maladie en Amérique du Nord [217]. Alors que plusieurs facteurs de risques existent de façon concomitante, c'est encore une fois l'âge qui semble

acteur principal de l'apparition de cette maladie; en effet, 95% des cancers endométriaux seront découverts chez des femmes de plus de 40 ans [218]. Toutefois, à la différence du cancer ovarien, le cancer endométrial est généralement détecté précocement, ce qui permet un traitement prompt et efficace; ces circonstances font du cancer endométrial une affliction largement moins létale que le cancer ovarien. Malheureusement, de 10 à 25% des tumeurs endométriales exhibent des métastases distantes au moment de la détection initiale. Ce sous-type de tumeurs représente un défi thérapeutique important de par la dissémination large et le caractère chimiorésistant de la maladie [219-222]. De plus, de 10 à 15% des tumeurs qui répondent initialement à la chimiothérapie et la radiothérapie récureront avant trois ans [223] et afficheront des taux de survie significativement inférieurs, se rapprochant plutôt du pronostique plus sombre associé aux cancers ovariens [220, 224].

Les cancers endométriaux peuvent être classés en deux catégories larges selon la catégorisation de Bokhman, cette dernière spécifiant les deux types majeurs de carcinomes endométriaux nommés, encore une fois de façon si évocatrice, tumeurs de type 1 et de type 2 [225]. Le groupe de tumeurs de type 1 rassemble les cancers d'origine endométrial de type adénocarcinomal et représente près de 80% des cancers endométriaux. Cette famille de tumeurs est observable dans les femmes périménopausales d'âge moyen qui présentent des hyperplasies endométriales atypiques. Ce groupe de tumeurs est aussi lié à des niveaux d'estrogène plus élevé que la moyenne, n'ont généralement pas un phénotype invasif et disséminant et sont, en moyenne, de grade et de stade plus réduit. Le groupe de tumeurs de type 2, pour sa part, regroupe les cancers non-différenciés et les sarcomes, à savoir les cancers émergents de cellules stromales. Ce type de tumeurs, présentant généralement un grade et un stade plus élevé que dans les cas des cancers de type 1, peut apparaître directement ou être le fruit de la dédifférenciation d'un cancer primaire épithéliale, ce qui explique la mortalité importante associée aux cancers récurrents de haut grade. On retrouve les cancers de type 2 dans les femmes plus âgées et les facteurs de risques classiques du cancer endométrial de type 1 ne sont pas applicables à ce type de tumeur, particulièrement en ce qui a trait à l'effet de l'estrogène sur leur apparition et leur croissance. Pour leur part, les tumeurs de type 2 présentent un pronostic très négatif [218,

226, 227]. D'un point de vue moléculaire, les tumeurs de type 1 sont fortement associées à des mutations activatrices dans la voie de signalisation PI3K/Akt et des mutations inhibitrices ou délétrices de PTEN; ces mutations sont aussi retrouvées, avec une incidence partiellement inférieure, dans les tumeurs de type 2 mais sont accompagnées de mutations sur p53 [228, 229] (Fig. 1.13). Toutefois, dans les deux types, la suractivation de l'axe signalétique PI3K/Akt/mTOR est significativement corrélée à un pronostic plus négatif, et ce, indépendamment du type histologique [230].

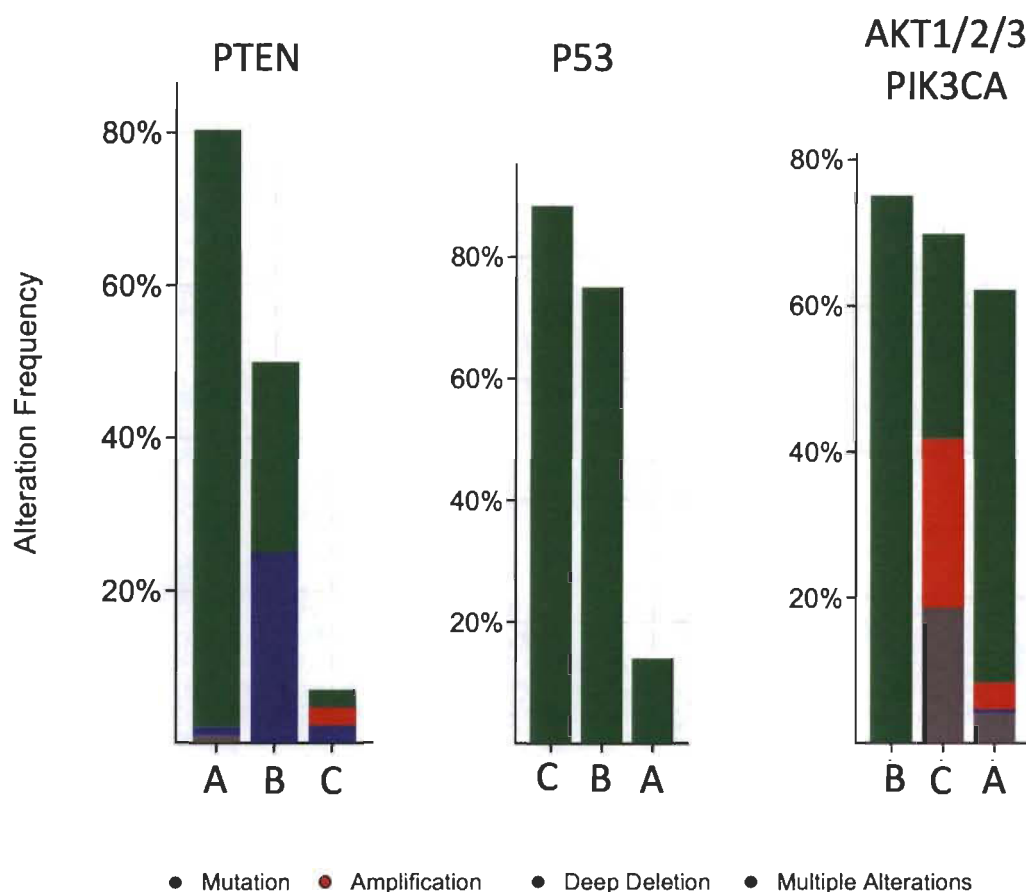


Figure 1.13

Mutations répertoriées dans les cancers utérins

Ces résultats de séquençages à haut débit montrent le pourcentage de mutations, de délétions, d'amplification et de mutations multiples retrouvées sur les gènes indiqués dans les tumeurs endométriales de trois types distincts, à savoir (A) les carcinomes endométriaux de type endométrioïdes (adénocarcinomes), (B) les carcinomes endométriaux d'autres types, (C) les carcinomes séreux. Les données sont tirées de la base de donnée de The Cancer Genome Atlas et incluent 2 études regroupant 586 tumeurs analysées. (Adapté de TCGA)

Afin de bien percevoir le rôle charnière du paysage mutationnel évoqué dans les dernières pages, il convient d'introduire plus en profondeur le concept d'apoptose, événement décisif et fatidique dans le destin cellulaire, dont la dérégulation consiste en l'un des plus importants obstacles dans la capacité de la cellule à maintenir l'homéostasie systémique et tissulaire.

1.5.5 Apoptose

Alors que plusieurs types de mort cellulaire programmée sont maintenant reconnus et mieux compris, tel que l'anoïkis, la catastrophe mitotique, la paraptose, la nécroptose et l'autophagie, notre attention se portera principalement sur l'apoptose, processus central du suicide cellulaire [231-233]. L'apoptose est un mécanisme moléculaire hautement conservé et ubiquitaire dans tous les types cellulaires, autant en contexte physiologique que pathologique. On peut comparer l'apoptose à la destruction contrôlée d'un bâtiment en pleine ville; des structures supportantes devront être érodées de façon experte pour permettre un affaissement quasi-chirurgical de l'édifice afin de minimiser les effets sur le bon fonctionnement du reste du quartier et éviter toutes blessures inopinées. De la même façon, l'apoptose permet une destruction structurée des cellules générant une inflammation négligeable et laissant derrière des débris facilement phagocytés.

Les cellules entrant dans le programme apoptotique présentent des caractéristiques typiques et constantes qui permettent l'identification de l'engagement de ce mécanisme qui a comme finalité l'activation des caspases. Ces dernières sont présentes au sein des cellules de façon constante sous forme de zymogène, protéines inactives nécessitant des transformations supplémentaires par clivage afin d'atteindre leur pleine activité. De cet événement découleront les caractéristiques classiques de l'apoptose, à savoir la fragmentation de l'ADN, la formation de vacuoles au sein de la cellule, le bourgeonnement de la membrane plasmique et nucléaire et le clivage intracellulaire de multiples protéines. Le clivage des caspases dites exécutrices, permettant la mort cellulaire à proprement parlé, est généralement rendu possible par l'activation de d'autres

caspases, à l'aube de l'induction de la mort programmée; on nommera ces dernières les caspases initiatrices, de par leur fonction précoce. Les mécanismes sous-jacents à l'activation de ces dernières sont, toutefois, multiples et diversifiés [234]; ces derniers sont regroupés sous deux bannières, la voie intrinsèque et extrinsèque de l'induction de l'apoptose. Alors que la voie intrinsèque est sensible aux stress génotoxiques et dépend de la mitochondrie pour accomplir sa fonction, la voie extrinsèque implique plutôt des récepteurs transmembranaires répondant à des effecteurs exogènes à la cellule [234-237].

Généralement, des dommages à l'ADN causés par divers facteurs environnementaux, comme par exemple des radiations ionisantes ou des molécules chimiothérapeutiques, mèneront à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose de façon complètement indépendante des récepteurs cytotocides. La pierre angulaire de ce système est p53, un facteur de transcription muté dans près de la moitié de tous les cancers jamais répertoriés, une démonstration importante de la pression sélective immense subie par cette protéine [238, 239]. De plus, près de 95% des mutations atteignant p53 semblent circonscrites à son domaine de liaison à l'ADN, abrogeant son activité pro-transcriptionnelle ou modulant sa spécificité, ce qui pourrait occasionner un remodelage complet du paysage transcriptionnel induit par l'activation de p53 [240, 241]. Les mécanismes pro-apoptotiques, et même anti-apoptotiques selon certaines données [242], régis par p53 sont d'une complexité inouïe et ne seront pas abordés en profondeur. Brièvement, en situation normale, on retrouve des niveaux relativement bas de p53 dans les cellules saines; ces niveaux seront augmentés et stabilisés via sa phosphorylation de la protéine et l'augmentation de la transcription du gène [239]. De plus, p53 se voit normalement dégradé par ubiquitination, processus rendu possible par la E3-ligase Mdm2; toutefois, suivant sa phosphorylation et son acétylation par d'autres interacteurs, p53 ne peut plus être ciblé par Mdm2, permettant son accumulation [243]; de façon fort intéressante, la protéine Mdm2 est elle-même une cible transcriptionnelle de p53, établissant ainsi une boucle de rétro-inhibition au sein de laquelle p53 favorise la présence de son propre inhibiteur [244]. Finalement, la régulation de la localisation cytonucléaire de p53 ajoute un degré de complexité à système, la localisation nucléaire de p53 étant implicitement nécessaire à sa fonction transcriptionnelle; nous aborderons les mécanismes

sous-jacents à la translocalisation de p53 dans une section subséquente. Suivant un stress génotoxique, ces mécanismes de stabilisation et contrôle de la localisation seront modulés, principalement via l'inhibition de Mdm2 et l'abrogation de sa capacité d'ubiquitination, afin de permettre une augmentation des niveaux de p53 et sa localisation nucléaire massive; s'ensuivra l'interaction de p53 avec ses cibles transcriptionnelles principales, qui auront comme objectifs d'interrompre le cycle cellulaire afin de réparer les dommages à l'ADN ou, si ces dommages sont irréversibles, d'induire le suicide cellulaire. Pour ce faire, p53 induira l'expression de protéines régulant négativement la progression dans le cycle cellulaire, comme p21, ou de protéines favorisant l'apoptose, comme les membres de la superfamille protéique Bcl-2. Notamment, l'expression de Bak, Bax, Bad et PUMA permettront l'assemblage d'un pore de perméabilisation membranaire mitochondrial et le relâchement subséquent du cytochrome C et de AIF, un facteur d'induction apoptotique central; certaines données sous-tendent même que p53 pourrait agir comme répresseur transcriptionnel de certains facteurs apoptotiques tels que la survivine, un inhibiteur direct des caspases [245]. De façon très intéressante, certains membres de la famille Bcl-2, tels que la protéine éponyme Bcl-2 et la protéine MCL-1, auront comme rôle d'inhiber la création de ce pore en interagissant avec Bak, Bad et Bax. Une fois le cytochrome C libéré dans le cytoplasme, on assistera à l'assemblage de l'apoptosome, un complexe protéique imposant capable de recruter et d'activer la procaspases-9, caspase initiateur principale de cette voie de signalisation; ce complexe activera par la suite des caspases exécutrices en clivant ces dernières, débutant la phase ultime de l'apoptose [235, 236, 246] (Fig. 1.14).

Parallèlement, la voie extrinsèque de l'apoptose implique plutôt des récepteurs transmembranaires ayant comme ligand des protéines diverses. Plusieurs récepteurs et ligands ont été identifiés jusqu'à maintenant, notamment FasL et son récepteur FasR, le TNF α et son récepteur TNFR1 ainsi que TRAIL et ses récepteurs DR4 et DR5; tous ces récepteurs sont regroupés dans la famille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor receptors; TNF-R) [237]. L'une des caractéristiques communes à ces récepteurs est la présence d'un domaine intracytoplasmique nommé domaine de mort (death domain) qui peut, suivant la liaison d'un ligand avec le segment extracytoplasmique du récepteur, recruter des protéines adaptatrices telle que FADD; cette

dernière recrutera elle-même la procaspase-8, caspase initiatrice principale de la voie extrinsèque de l'apoptose. Ce complexe formé de FADD et de procaspase, nommé le complexe de signalisation induisant la mort (death inducing signaling complex; DISC) pourra par la suite activer les caspases exécutrices par clivage et permettre l'induction de la mort cellulaire [247]. Il existe aussi une voie perpendiculaire, permettant à un signal extrinsèque d'élancer une réponse impliquant des acteurs de la voie intrinsèque dans la réponse cellulaire. BID, lorsque clivé par le DISC, adoptera une forme tronquée nommée t-BID qui gagnera la faculté de s'oligomériser avec Bax afin de former le pore mitochondrial nécessaire à la formation de l'apoptosome (Fig. 1.14). Il est donc possible, via un ligand extracellulaire, d'induire une réponse apoptotique mitochondriale [248, 249].

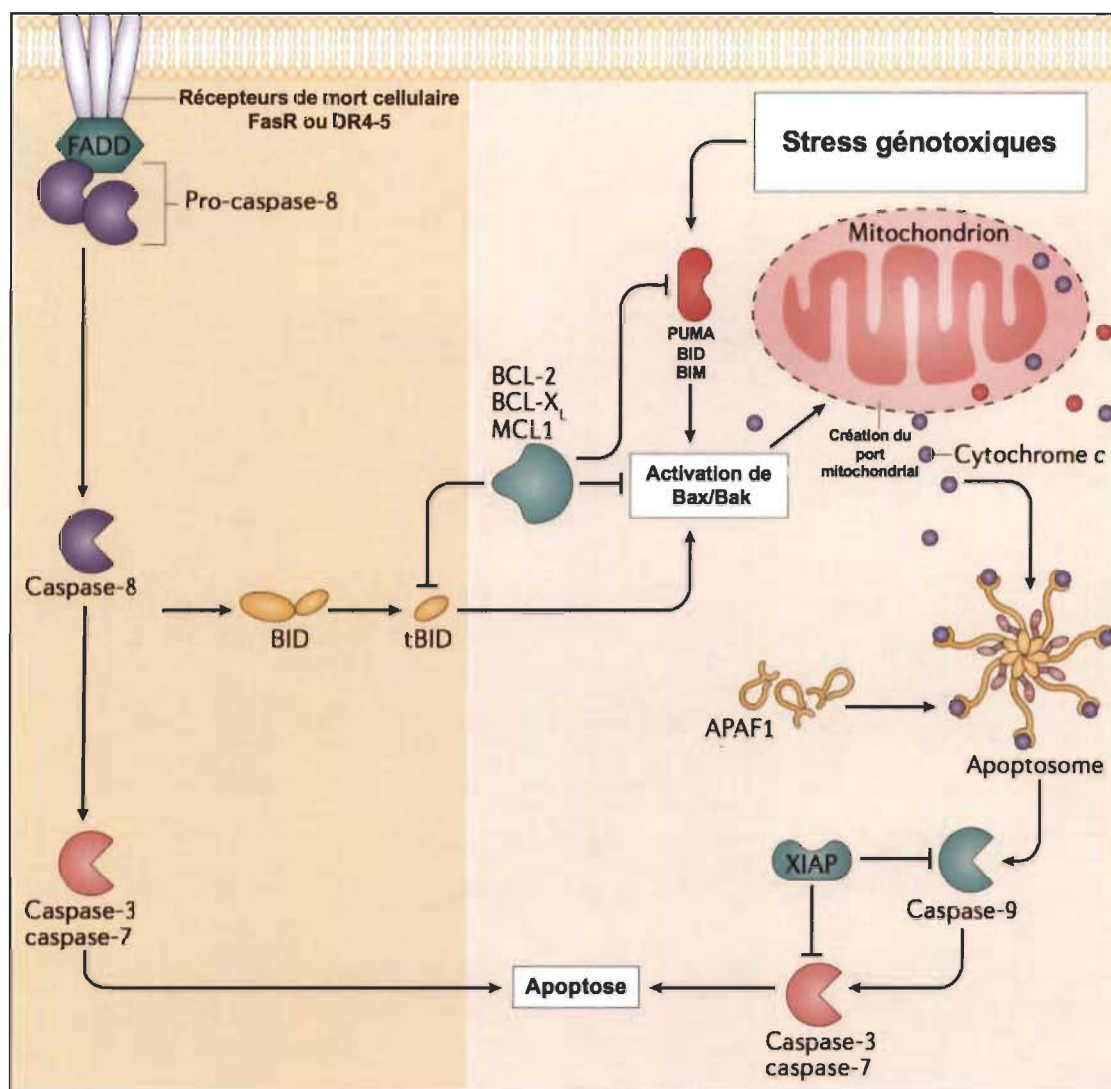


Figure 1.14

Illustration diagrammatique des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose

La voie extrinsèque, à gauche, permet l'activation de la mort cellulaire via des systèmes de transmission de signal inter-cellulaire; pour sa part, la voie intrinsèque, à droite, permet l'auto-régulation cellulaire en regard des dommages et des stress perçus par la machinerie intra-cellulaire. Les deux systèmes sont liés par BID, sorte de pont moléculaire permettant l'activation transversale du système intrinsèque par l'extrinsèque.

(Adaptée de Tait et al. 2016)

La finalité convergente de ces deux voies de signalisation, autant extrinsèque qu'intrinsèque, tient dans l'activation des caspases-3, -6 et -7; toutefois, c'est la caspase-3 qui apparaît comme l'exécutrice définitive du programme apoptotique. Au moment de son activation, la caspase-3 induira l'activation des DNase activées par les caspases (caspase activated DNase; CAD) en clivant son inhibiteur implicite, ICAD; s'ensuivra une fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire. La caspase-3 est aussi indirectement responsable de l'extériorisation de la phosphatidylsérine, un des premiers événements du programme apoptotique [250]; c'est aussi la caspase-3 qui clive PARP, une enzyme de réparation de l'ADN, un événement caractéristique d'un programme apoptotique avancé. En somme, le clivage de la caspase-3, associé à l'inéluctabilité presque complète de son activation, fait office d'excellente mesure de l'induction de l'apoptose, n'excluant ni le programme intrinsèque ou extrinsèque. Certaines protéines, toutefois, peuvent s'opposer à l'activité des caspases. Ces protéines inhibitrices de l'apoptose (Inhibitor of Apoptosis Proteins; IAP), permettent à une cellule comportant des caspases clivées d'échapper à la destruction en inhibant l'activité catalytique des exécuteurs apoptotiques. De pair avec les protéines de la famille Bcl-2 capable d'entraver le relâchement du cytochrome C, ces protéines sont les principales responsables de la dysfonction du suicide cellulaire, et de l'incapacité cellulaire à gouverner sa réponse aux stimuli extrinsèques et intrinsèques inducteurs d'apoptose. La cessation généralisée de la réponse à ces signaux a comme conséquence clinique l'inefficacité thérapeutique des composés chimiothérapeutiques pro-apoptotiques, et donc, la chimiorésistance.

1.6 Chimiothérapie et chimiorésistance

La première instance utilisation d'un composé pharmacologique dans le but de diminuer la croissance ou la progression d'une néoplasie tient dans les efforts de Farber, qui en 1947 utilisa l'aminoptérine; cette homologue de l'acide folique permet, pour la première fois, le traitement efficace, même si non-curatif, d'enfants touchés par la leucémie. À noter que précédents les efforts titanesques de Farber, le protocole officiel, au Boston Children Hospital, de traitement des enfants leucémiques se résumait à « transfuse and send home to die » (transfuser et envoyer à la maison pour mourir) [251]. Évidemment, les traitements anticancéreux ont subi un saut quasi quantique depuis cette

époque, mais le rationnel de traitement reste le même : intervenir au sein de la tumeur en interférant avec les mécanismes fondamentaux permettant sa croissance tout en limitant les dommages aux cellules saines.

Tout d'abord, suivant un diagnostic de cancer la première ligne de traitement tient généralement dans la chirurgie, qui a comme objectif de réduire au maximum la masse tumorale; évidemment, la chirurgie présente une efficacité importante lorsque la délocalisation tumorale est limitée et que peu de métastases sont apparues. Les métastases distantes, pour leur part, devront être traitées avec une chimiothérapie, stratégie possédant un effet systémique plutôt que localisé. De plus, des traitements de radiothérapie peuvent être octroyés aux patients. Cette méthode consiste en l'utilisation d'un faisceau de radiations ionisantes à haute précision qui endommageront l'ADN des cellules. Les tumeurs étant plus sensibles aux dommages à l'ADN de par leur incapacité à réparer ces derniers additionné à leur potentiel prolifératif accru, permettront la destruction ciblée des cellules tumorales; toutefois, encore une fois, la radiothérapie n'est pas particulièrement indiquée dans le cas de tumeurs hautement agressives et métastatiques, et les traitements de ce type de tumeurs se verront fréquemment supplémentés de chimiothérapies diverses afin d'agir de façon généralisée. Considérant que ce sont les cancers agressifs, de haut grade, de stade avancé et résistants à la chimiothérapie qui expliquent les taux de décès élevés des cancers gynécologiques et que le traitement chimiothérapeutique est l'option thérapeutique principale dans ces cas [212, 252-256], l'optimisation de l'efficacité de ces stratégies apparaît comme cruciale dans l'avancé de la qualité des traitements et devrait se traduire par une amélioration directe des pronostiques associées à ce type de cancers.

Il est possible de définir deux grandes classes de composées chimiothérapeutiques; classiquement, ces molécules auront une action cytotoxique, via des dommages irréversibles à l'ADN ou l'appareil mitotique, et provoqueront la mort des cellules cancéreuses de par leur capacité répllicative largement plus élevée que la moyenne. De ce fait, les cellules à haut potentiel prolifératif retrouvé dans le corps, comme par exemple les follicules pileux, seront aussi plus ou moins touchées par ce type de thérapie. L'autre type de thérapie, elle, s'attaque plutôt à des caractéristiques moléculaires spécifiques des

cancers en inhibant ou interférant avec des voies de signalisations nécessaires à l'atteinte des caractéristiques du cancer et créant une susceptibilité unique au sein de ce type de cellules; on parle ici de thérapie ciblée. L'avantage principal de ce type de stratégie thérapeutique est l'effet minime observé dans les cellules normales; en effet, il ne semble pas exagéré de considérer la sélectivité des thérapies comme le critère ultime de l'efficacité des protocoles de chimiothérapie. Alors que l'arsenal de composés chimiothérapeutiques cytotoxiques reste largement inchangé depuis des décennies, l'armamentarium de molécules utilisées pour la thérapie ciblée, lui, est en plein essor. On recense une multitude de nouvelles molécules inhibitrices pour une multitude de mutations et voies de signalisation spécifiques [252, 257, 258].

Malgré tout, on peine encore à traiter certaines tumeurs qui exhiberont une réponse thérapeutique limitée à nos efforts pharmacologiques. Ce phénomène, c'est la chimiorésistance, qui peut être catégorisée en deux classes distinctes mais dont la frontière limitrophe apparaît comme parfois très ténue. La résistance intrinsèque représente l'abileté innée d'une tumeur à résister aux traitements de première intention alors que la résistance acquise comprend plutôt les mécanismes de sélections auxquels une tumeur répondante aux traitements sera assujettie et qui permettront la cessation éventuelle de l'efficacité de la thérapie. La résistance intrinsèque serait donc plutôt mise en cause lorsqu'un patient voit sa tumeur croître et se disséminer alors que la résistance acquise serait associée à la rémission suivie de récurrence. Dans le cas des cancers endométriaux, le caractère récurrent des maladies les plus mortelles montre bien l'impact létal de l'acquisition de la chimiorésistance; des tumeurs qui d'abord étaient répondantes à des composés cytotoxiques tels que le cisplatine seront hautement réfractaires au même traitement lors de leur récurrence. Dans le cas du cancer ovarien, même en l'absence de rémission, il semble qu'une sous-population de cellules développe une résistance aux composés cytotoxiques généralement utilisés, à savoir le paclitaxel et le cisplatine, ce qui permet à la tumeur qui répondait initialement adéquatement au traitement de se soustraire à son effet curatif. Dans tous les cas, les doses de composés cytotoxiques nécessaires à l'obtention d'une réponse tumorale deviennent si élevées que le caractère spécifique des thérapies est perdu. Malheureusement, l'hétérogénéité tumorale rend extrêmement

difficile la différenciation et l'identification exacte et des mutations et autres événements moléculaires responsables des chimiorésistances acquises au contraire d'innées; de plus, notre incapacité à étudier de façon parfaitement longitudinale l'établissement et la dissémination des tumeurs, autant d'un point de vue macroscopique que microscopique, rend l'identification de causalité presque impensable selon les moyens techniques actuels. Toutefois, certaines voies de signalisation, précédemment abordées pour la plupart, sont mises en relief dans la littérature comme responsable de l'apparition de la chimiorésistance; cibler ces voies avec des molécules à l'action focalisée, de concert avec l'utilisation de composés cytotoxiques, semble donc l'approche globalement la plus pertinente pour restaurer la sensibilité des tumeurs à l'action cytocide spécifique recherchée lors des traitements.

Hormis les inducteurs de la voie intrinsèque de l'apoptose, comme les composés à base de platine et les anthracyclines, il existe des molécules permettant l'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose. Dans ce cas, plutôt que d'endommager de façon irréversible l'ADN, ces agents permettront l'activation de récepteurs transmembranaires qui engageront cette voie alternative du suicide cellulaire. Il existe évidemment plusieurs molécules de ce type; la première jamais décrite fut le facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor;TNF- α), une molécule capable, plausiblement via les macrophages activés, d'induire la mort cellulaire dans une variété de néoplasies [259]; toutefois, la première molécule développée fut l'anticorps anti-fas, découvert suite au criblage de protéines se fixant à la surface de cellules humaines, une tâche qui aura nécessité en 1989 plus de 20 000 hybridomes. L'anticorps anti-Fas ainsi développé fut démontré comme empruntant le récepteur au TNF pour induire la mort cellulaire, de façon semblable au TNF- α [260]. Depuis cette époque, qui représente les balbutiements de notre compréhension des inducteurs extrinsèque de l'apoptose, de multiples autres protéines et récepteurs ont été décrits et les interactions distinctes entre les membres de cette famille protéiques ont été précisés. L'un des membres de cette famille, le ligand inducteur d'apoptose de la famille des TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand;TRAIL) a été initialement décrit en 1990 comme capable d'induire l'apoptose dans une variété de lignées cellulaires de diverses origines tissulaires [261]. L'intérêt principal du TRAIL tient

dans sa capacité thérapeutiquement avantageuse d'induire l'apoptose spécifiquement dans les cellules transformées en épargnant les cellules saines; de surcroît, TRAIL ne semble pas présenter la toxicité systémique retrouvée lors des thérapies mettant en œuvre les autres membres de la famille du TNF [247, 262-265]. Deux récepteurs transmembranaires peuvent lier le TRAIL, naturellement trimérique, et sont capables d'induire l'apoptose; ces deux récepteurs, DR4 et DR5, possèdent des homologues inactifs, DcR1 et DcR2. Ces derniers, au contraire de DR4 et DR5, ne présentent pas de domaine intracellulaire de mort, ce qui abolit leur capacité à recruter les interacteurs intracellulaires nécessaires à l'induction de l'apoptose. En effet, lors de la liaison des trimères de TRAIL sur les récepteurs actifs, ces derniers se trimériseront et recruteront, à l'aide de leur domaine intracellulaire, les protéines associées à Fas avec domaine de mort (Fas-associated protein with death domain; FADD) sur le feuillet interne de la membrane cytoplasmique. Les FADD, à leur tour, mobiliseront les procaspases-8 et -10, ce qui parachèvera l'assemblage du DISC, plateforme signalétique en amont de la voie extrinsèque de l'apoptose. Ce processus se solde par l'activation par clivage des caspases-8 et -10 et leur relâchement dans le cytosol, permettant le clivage de leurs cibles spécifiques.

Alors que plusieurs cancers gynécologiques développeront des résistances aux composés à base de platine ou d'anthracyclines à des stades plus avancés [252], la majorité d'entre eux sont presque complètement résistants à l'induction de l'apoptose par TRAIL [265-268]. Même si plusieurs essais cliniques évoquaient le vaste potentiel des thérapies à base de TRAIL à agir de façon spécifique et efficace, cet enthousiasme initial s'est évaporé suivant la constatation que les thérapies à base de TRAIL faillissaient à éliciter des réponses thérapeutiques robustes [265]. Les fondements moléculaires de cet échec restent encore partiellement obscurs. En effet, alors que les molécules chimiothérapeutiques cytotoxiques interagissant avec l'ADN produisent des dommages aléatoires dans le matériel génétique et que la réponse n'est pas induite directement par l'agent mais bien par la réponse complexe du système de contrôle de l'intégrité génomique cellulaire, les inducteurs extrinsèques de l'apoptose stimulent de façon directe des mécanismes entièrement dédiés à l'induction du suicide cellulaire. La majorité des essais cliniques ayant montré l'inefficacité des membres de la famille du TNF comme agents

anticancéreux et une question sans équivoque émerge inéluctablement : comment expliquer l'échec de ce type de thérapie, qui s'appuie sur les mécanismes endogènes de l'induction de la mort cellulaire, mécanismes d'un raffinement exceptionnel et déterminé par une sélection évolutive d'une rigueur formidable?

Les mécanismes de résistance au TRAIL, de façon similaire à la voie mitochondriale de l'apoptose où on retrouve des inhibiteurs de la famille de Bcl-2 qui entraveront le relâchement du cytochrome C, mettent en scènes des inhibiteurs de la voie apoptotique extrinsèque qui limite l'induction de cette dernière. En premier lieu, tel que mentionné plus haut, l'inactivité fonctionnelle des récepteurs leurres réduit la disponibilité du TRAIL en liant de façon compétitive ce dernier; cela se traduit donc par la capacité de DcR1 et DcR2 à dépotentialiser l'apoptose induite par TRAIL[269]. La dérégulation de l'expression de ces récepteurs, généralement exprimés par les cellules normales et permettant en partie le caractère spécifique de l'induction de l'apoptose permis par TRAIL, pourrait servir de mécanisme d'obfuscation de leur nature par les cellules tumorales[270-273]. D'un autre côté, la protéine inhibitrice cellulaire ressemblant au FLICE (cellular FLICE-like inhibitory protein;cFLIP) agit directement sur le DISC en inhibant sa capacité à lier les caspases-8 et -10. Pour se faire, cFLIP utilise des domaines d'interaction avec FADD et contrevient à la liaison des caspases avec ce dernier. Classiquement, on considère donc que cFLIP représente donc une entrave à l'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque [274]. De façon fort intéressante, certaines données suggèrent que l'expression de cFLIP soit dépendante de la signalisation de NF- κ B [275, 276].

Parallèlement, certains inhibiteurs de l'apoptose sont communs aux voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose. La protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (X-linked inhibitor of apoptosis protein; XIAP), dont l'expression semble contrôlée par le TGF- β [191], limite l'activité des caspases-3, -7 et -9 clivées en interagissant directement avec elles [277-280]. Cela paralyse donc, nonobstant l'activation en amont des voies pro-apoptotiques, la capacité de ces voies à atteindre leur finalité cytocide. En effet, l'inhibition des caspases exécutrices vient court-circuiter

complètement l'accomplissement du programme apoptotique. De surcroît, XIAP, via son domaine E3-ligase, semble capable d'ubiquitiner la phosphatase PTEN et d'induire sa protéolyse dépendante du protéasome; s'ensuivra ainsi une suractivation de la voie PI3K/Akt par la cessation de l'action inhibitrice de PTEN sur l'accumulation de PIP₃ [281]. Considérant ces informations, il n'est pas étonnant de constater que la surexpression de XIAP est un facteur de résistance aux chimiothérapies à base de molécules génotoxiques ainsi qu'à l'action du TRAIL dans les cancers ovariens et endométriaux; implicitement, il est permis de croire que la régulation négative de XIAP permet la resensibilisation au TRAIL, au cisplatine et à la doxorubicine [252, 280, 282-284]. De plus, plusieurs données permettent de croire que XIAP agit comme molécule charnière déterminant la sensibilité des cellules à l'action de la voie extrinsèque de l'apoptose, positionnant XIAP comme un régulateur fondamental du destin cellulaire et de la chimiorésistance [285]. Finalement, Bcl-2 et Mcl-1, modulateurs cruciaux de la voie mitochondriale de l'induction du suicide cellulaire, semblent agir comme rhéostats de la sensibilité des cellules au TRAIL, cette fois via le contrôle de l'activité de la voie horizontale existant entre les mécanismes apoptotiques extrinsèques et intrinsèques [286].

De concert avec les molécules chimiothérapeutiques, la plupart des cancers gynécologiques seront d'abord traités avec des molécules modulant l'œstrogène et ses récepteurs, des cibles de choix dans le cas de cancers hormonodépendants. Une grande proportion de récepteurs à l'œstrogène est retrouvée dans les tissus ovariens et endométriaux et c'est cette hormone stéroïdienne qui est responsable de la croissance initiale de plusieurs de ces tumeurs. Toutefois, alors que l'utilisation de modulateurs sélectifs des récepteurs à l'œstrogène comme le tamoxifène ainsi que les inhibiteurs purs du récepteur à l'œstrogène comme le fulvestrant est couronnée de succès dans les cancers du sein, ces derniers présentent une efficacité plutôt limitée dans le cas de cancers ovariens [287-290] et endométriaux [291-295]. L'identification de solutions alternatives semble donc une priorité. Notons quand même que ces composés sont généralement excessivement bien tolérés par les patientes et ont parfois un effet stabilisant sur la croissance tumoral, deux effets qui font de ces médicaments des choix peu risqués et pouvant potentialiser l'utilisation de molécules chimiothérapeutiques plus efficaces. De

plus, des composés plus récents comme l'arzoixifene, semblent démontrer une efficacité plus robuste, particulièrement dans le cas des cancers endométriaux hormonodépendants. Étant donné la place centrale de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans la tumorigénèse générale, des stratégies thérapeutiques mettant en œuvre l'interférence avec ces voies de signalisation sont actuellement étudiées. De ce fait, un nombre important de molécules visant ces protéines ont été développées afin d'enrayer l'activité de ces kinases et lutter contre la chimiorésistance.

1.6.1 Rôle de la voie PI3K/Akt dans la chimiorésistance

Le rôle d'Akt dans le développement de la chimiorésistance est démontré dans une pléthore de tissus; il apparaît juste de dire que le rôle de cette kinase est ubiquitaire dans le développement oncogénique et la capacité des tumeurs ainsi générée de résister aux thérapies octroyées. Nous nous concentrerons toutefois sur les cancers gynécologiques, un contexte pathologique au sein duquel la faculté de ce sentier signalétique à agir comme vecteur de chimiorésistance est particulièrement bien décrite. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR agit généralement comme béquille moléculaire, permettant à la cellule de se dissocier de l'influence microenvironnementale pour subvenir à ses besoins de facteurs trophiques et permettre ainsi son autosuffisance proliférative. De plus, la voie de signalisation PI3K/Akt permettant la régulation positive de plusieurs inhibiteurs de l'apoptose, une suractivation de cet axe signalétique fragilisera l'intégrité de plusieurs mécanismes intrinsèques entourant la mort programmée, permettant à la cellule d'échapper à la mort cellulaire qui l'attendrait suivant des insultes pro-apoptotiques (Fig. 1.15). En effet, la suractivité de PI3K/Akt semble une condition quasi sine qua non de l'établissement de la chimiorésistance dans ces tissus [143, 253, 254, 296-299]. De plus, la cellule cancéreuse semble capable de répondre à l'effet de plusieurs molécules chimiothérapeutiques en augmentant l'activité d'Akt, un effet contré par l'utilisation d'inhibiteur de cette voie de signalisation [254, 297, 298, 300].

De façon plus générale, tel que mentionné précédemment, l'activation de l'axe PI3K/Akt permet l'induction de la voie mTOR, un régulateur positif de la prolifération cellulaire; de par ce simple fait, la suractivité de PI3K/Akt se traduit donc par une

résistance plus prononcée aux agents chimiothérapeutiques [301]. La phosphorylation de p70S6K et de S6 sont deux marqueurs de résistances tumorales et d'invasivité, indiquant que ces événements moléculaires, découlant généralement directement d'une activation verticale PI3K/Akt/mTORC1, sont corrélés à l'évasion par les cellules cancéreuses des contraintes antiprolifératives normales [302-304]; l'inhibition de ces voies permet même la resensibilisation des cellules aux agents chimiothérapeutiques [305, 306].

La voie NF- κ B occupe, elle aussi, un rôle important dans la résistance aux thérapies avec un effet particulièrement prononcé pour les molécules tels le cisplatine ou la doxorubicine, inductrices des dommages à l'ADN mais aussi aux inducteurs extrinsèques de l'apoptose comme le TRAIL [307-309]. Pour permettre sa signalisation, cette voie s'appuie sur cinq protéines, p50, p52, p65, RelB et c-Rel, formant des homo et hétérodimères. L'ensemble ces protéines présentent des fonctions spécifiques dépendantes des types cellulaires et des voies de signalisation qui induise leur activation; le dimère p50/p65, toutefois, représente la voie canonique la mieux décrite et étudiée et fera l'objet de nos études. En absence d'activation, les sous-unités p65/p50 sont séquestrées dans le cytoplasme par leur interaction avec l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B. Deux voies de signalisation permettent principalement cette activité, à savoir la voie des récepteurs TLR ou la voie PI3K/Akt, qui tous deux pourront phosphoryler, et ainsi activer, la kinase de I κ B (I κ B kinase;IKK) [310, 311]. La phosphorylation de I κ B par IKK permettra le relâchement de ce dernier du complexe inhibiteur, du découverturement des NLS ornant p50/p65 et leur translocation vers le noyau, où ils pourront induire la transcription de leurs gènes cibles tels que Bcl-2 et MCL1 [312, 313]. Des résultats montrent aussi que la voie PI3K/Akt/mTOR, via l'activation de mTORC1, favoriserait la traduction des ARNm produits par la transcription permise par NF- κ B [312-314]. Finalement, les fonctions de NF- κ B sont plus complexe qu'il n'y paraît, avec des démonstrations suggérant un rôle autant proapoptotique qu'anti-apoptotique dans certains contextes, soulignant le rôle biphasique plutôt que binaire de ce facteur de transcription central à divers programmes cellulaires [315].

Akt inhibe la signalisation par les FOXO, des facteurs de transcriptions clés dans l'opposition à la transformation oncogénique et la réponse aux stimuli anti-prolifératifs [316]. De façon fort intéressante, les FOXO ne sont que très rarement mutés dans les cancers. C'est plutôt l'inactivation des FOXO, par l'exportation nucléaire et séquestration cytoplasmique induite par leur phosphorylation par Akt [317, 318], qui permet d'étouffer leur activité transcriptionnelle, cette dernière stimulant normalement l'expression de plusieurs facteurs antiprolifératifs et pro-apoptotiques tels que p21, p27 et BIM, une protéine proapoptotique de famille BCL-2; cette altération expressionnelle agit potentiellement comme vecteur de résistance aux chimiothérapies [316, 319]. Les FOXO, dans certaines circonstances, posséderaient aussi la capacité d'interagir avec la voie de signalisation de p53, leur activation concomitante potentialisant l'expression de BIM, p21 et PUMA, un modulateur de perméabilisation mitochondriale [316, 320]. Finalement, de façon plus directe, Akt agit comme régulateur de cette perméabilisation en contrôlant phosphorylant Bad [321]. Cette dernière, lorsque phosphorylée, sera séquestrée par la protéine 14-3-3, entravant la capacité de Bad de séquestrer elle-même Bcl-2 et MCL1 [322-324]. La phosphorylation de BAD est robustement associée à la résistance aux thérapies, un marqueur moléculaire qui pourrait même revêtrer un potentiel prédictif d'efficacité thérapeutique chez les patientes atteintes de cancer ovarien et endométrial [325, 326].

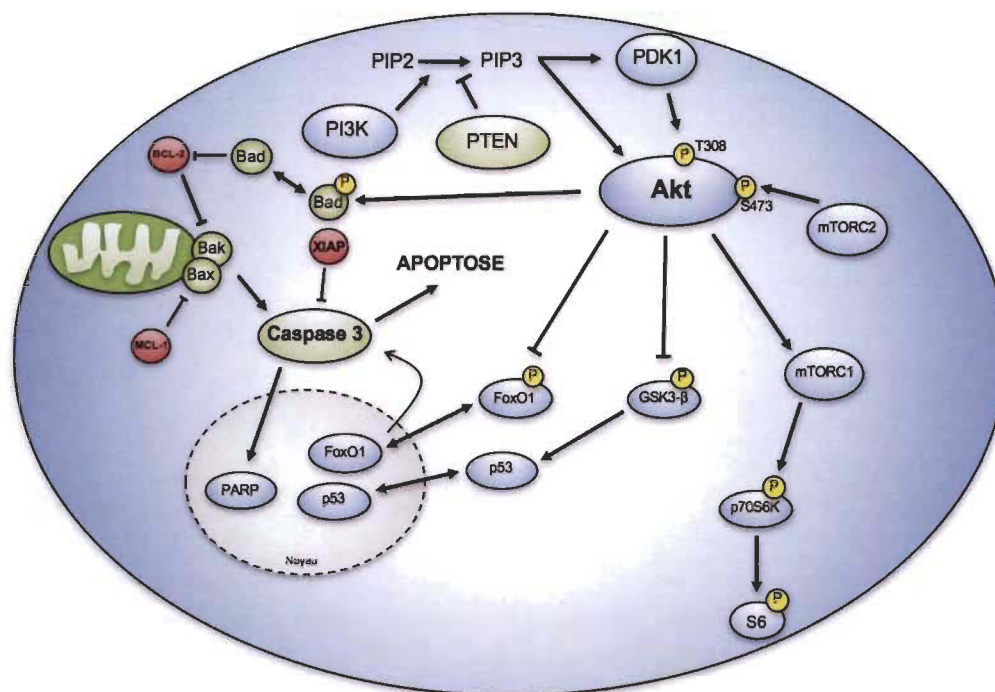


Figure 1.15 Représentation diagrammatique des voies de signalisation impliquées dans la chimiorésistance médiée par Akt

La voie Akt est centrale au destin cellulaire via le contrôle d'une multitude de voies de signalisation en aval. Grâce à son activité kinase, Akt se voit capable de contrôler la localisation nucléaire de facteurs de transcription (FOXO1, p53), d'activer la synthèse protéique (mTor) et d'opposer l'induction de l'apoptose (Bad).

Alors que le rôle d'Akt dans ces processus apparaît comme irréfutable, le contrôle exercé par les diverses isoformes d'Akt sur les processus de chimiorésistance a peu été étudié et les mécanismes moléculaires permettant un effet spécifique à chacun d'entre eux ne sont pas élucidés. Toutefois, des généralités émergent des expériences conduites jusqu'à maintenant. D'abord, dans le contexte du cancer ovarien, les seuls résultats qui, à ma connaissance, suggéraient qu'Akt2 participe singulièrement à la résistance au cisplatine ont malheureusement été rétractés [327]; ces derniers, de surcroît, entraînent en conflit avec des données récentes suggérant principalement le rôle de Akt1 dans la croissance tumorale ovarienne [328]. À noter que cette étude n'impliquait pas le concept de chimiorésistance mais bien d'établissement tumoral. En contrepartie, dans les cancers endométriaux, seuls Akt1 et Akt2 semblent permettre la résistance au cisplatine et au paclitaxel, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules; les trois isoformes,

toutefois, semblent participer au phénomène de résistance à la doxorubicine [253, 254, 280]. Malgré ce faible nombre d'études, les données dégagées des expériences impliquant des souris arborant diverses combinaisons de double-knockout prouvent l'unicité fonctionnelle occupée par les isoformes d'Akt [329-332]. Le piètre constat du faible nombre de données disponibles quant au rôle individuel des isoformes d'Akt décrit de façon tristement sommaire notre profond manque de compréhension des mécanismes moléculaires permettant la modulation raffinée effectuée par cette voie de signalisation.

1.6.2 Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt

Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de molécules modulant la voie PI3K/Akt/mTOR considérant son rôle bien établi dans les processus de chimiorésistance innée comme acquise. Les premières générations de molécules inhibant la voie PI3K/Akt tels le LY294002 et la Wortmannin, fonctionnaient via l'inhibition directe de PI3K [333, 334]. Les résultats obtenus à l'aide de ces molécules ont permis de disséquer partiellement les voies de signalisation permettant la résistance aux molécules chimiothérapeutiques; toutefois, cliniquement, leurs caractéristiques pharmacodynamiques étroites et limitantes ont obligé le développement d'inhibiteurs de nouvelle génération. Nous nous concentrerons sur deux inhibiteurs, à savoir le NVP-BEZ235 et le AZD5363 [335, 336].

Le NVP-BEZ est un inhibiteur bivalent capable d'inhiber PI3K et mTOR. Une étude préclinique a suggéré l'efficacité de cette molécule dans le contexte du cancer ovarien, autant *in vivo* qu'*in vitro*. De plus, en procédant à des expériences utilisant des lignées cellulaires sensibles et résistantes aux cisplatine, les auteurs ont pu constater que le NVP-BEZ235 resensibilisait les cellules réfractaires aux traitements chimiothérapeutiques. De plus, la même étude suggérait que les mutations d'activation dans la voie PI3K/Akt et les mutations d'inactivations de PTEN étaient fortement corrélées à l'efficacité des traitements de cet inhibiteur [337]. Une autre étude suggérait que le NVP-BEZ235 inhibait de façon significative la prolifération cellulaire de cellules de cancers ovariens à cellules claires et de type séreux; toutefois, cette étude ne relevait pas de corrélation entre

l'expression protéique d'Akt ni avec le profil mutationnel des lignées cellulaires [338]. Finalement, le NVP-BEZ235 semble capable d'inhiber la croissance des cellules du cancer endométrial; cet effet semblait exarçbé par l'utilisation concomitante d'un inhibiteur de la voie des MAPK [339]. L'AZD5363, un inhibiteur compétitif pour la pochette d'interaction à l'ATP d'Akt, a aussi été scruté par plusieurs études précliniques qui ont suggéré son potentiel comme thérapie antitumorale, dans le contexte d'une multitude de types tumoraux, incluant celles endométriales [336, 340, 341](NCT01226316,NCT01353781). De façon très intéressante, une corrélation positive entre des mutations de PTEN et PIK3CA est rapportée par dans l'étude de Davies et collègues; toutefois, une analyse plus approfondie des données supplémentaires disponibles pour cet article montre, en réalité, l'absence de corrélation entre la réponse à l'AZD5363 et le profil mutationnel exhibé par les lignées endométriales utilisées lors des tests MTS. Malheureusement, à l'exception d'un seul résultat présent dans l'étude citée précédemment montrant, par MTS, une sensibilité modeste de la lignée OVCAR-3 à l'AZD5363, aucune information n'est disponible en ce qui a trait à l'action de cette molécule dans le cancer ovarien. Finalement, pour tous les études et essais cliniques, très peu de données sont disponibles quant aux mécanismes expliquant l'effet d'inhibition de la prolifération ou de sensibilisation des cellules étudiées. Le constat principal pouvant être dégagé des études précliniques et de façon encore plus frappante dans le cas des essais cliniques est l'inefficacité de l'utilisation singulière de ces agents; l'utilisation de thérapies combinées, exploitant l'action concomitante d'un inducteur d'apoptose de concert avec une molécule permettant l'abrogation ciblée d'une voie de signalisation charnière, nous apparaît donc comme une stratégie thérapeutique intéressante.

Toutefois, d'autres cibles moléculaires, non-kinasiques, sont aussi étudiées afin de lutter contre les cancers et des molécules permettant leur inhibition sont aussi développées. L'une de ces cibles, la protéine d'exportation nucléaire CRM1, semble receler un potentiel thérapeutique attrayant, particulièrement en vue de l'importance capitale de la dynamique de localisation cytonucléaire mise en évidence à travers les précédents paragraphes.

1.6.3 CRM1

La protéine d'entretien des régions chromosomales (chromosome region maintenance 1 protein; CRM1), aussi appelée exportine-1 (exportin 1; XPO1), appartient à la superfamille protéique des transporteurs se liant au RanGTP. La fonction primordiale de ce type de navette est de réguler et de faciliter le transport des ARN, des protéines et des RNP à travers le pore nucléaire afin d'extruder ces molécules du noyau vers le compartiment cytoplasmique [342] (Fig. 1.16). La présence d'un signal d'export nucléaire (nuclear export signal; NES) permet l'interaction entre CRM1 et ses cargos et son exportation nucléaire subséquente; la présence d'un NES sur la protéine ciblée pour l'export nucléaire semble critique à l'interaction entre CRM1 et cette dernière [343]. Une séquence d'exportation classique $\Phi 1-X_{2,3}-\Phi 2-X_{2,3}-\Phi 3-X-\Phi 4$, où Φ indique la présence d'une Val, Ile, Phe, Leu ou Met et X indique n'importe quel a.a, est connue depuis longtemps. Toutefois, des données récentes ont permis d'identifier une NES plus raffinée ($\Phi 1-X_{2,3}-\Phi 2-[^W]_3-\Phi 3-[^W]-\Phi 4$, où W indique la présence de n'importe quel a.a sauf le Trp) qui présente une homologie importante avec la séquence classique mais donne un pouvoir prédictif plus important aux algorithmes tentant d'identifier les protéines ciblées par CRM1 [344].

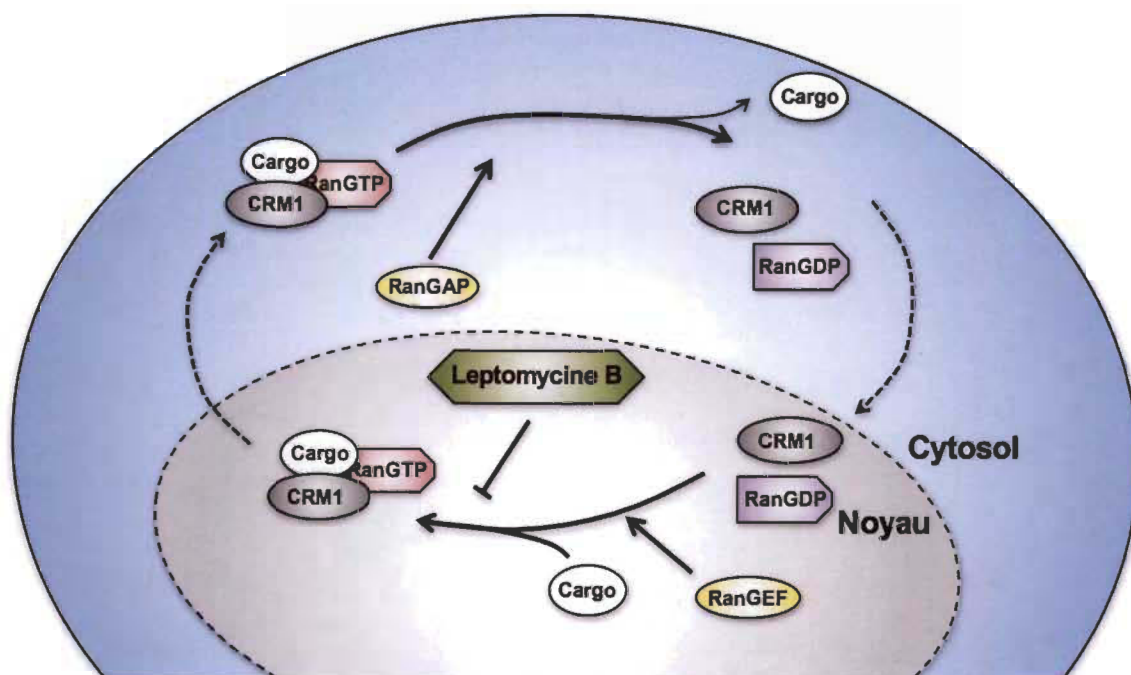


Figure 1.16 Représentation diagrammatique du mécanisme d'extrusion nucléaire opéré par CRM1.

CRM1 agit comme navette nucléocytoplasmique en instrumentalisant les gradients de RanGTP et de RanGDP pour permettre sa cyclicité et la directionnalité de son transport (Nguyen et al. 2012). La leptomycine B permet d'enrayer complètement ce processus (Kudo et al. 2010).

La leptomycine B (LMB) est un antifongique d'origine microbienne qui inhibe irréversiblement l'interaction entre CRM1 et ses cibles. Ce composé présente une activité antitumorale importante et permet l'induction de l'apoptose dans un spectre de cancer très diversifié, et ce, même dans le contexte de cancers considérés comme chimiorésistants [345-349]. Le mécanisme principal expliquant cette capacité tumoricide semble passer par l'inhibition de l'exportation nucléaire de plusieurs suppresseurs de tumeurs et l'induction de leur accumulation au noyau; la plupart d'entre-eux étant des facteurs de transcription, leur localisation nucléaire est obligatoire pour induire la mort cellulaire [255, 347, 348, 350-352]. Son utilisation efficace dans une variété de types tumoraux en fait un composé de choix pour le développement de thérapies innovantes. Des études récentes utilisant le KPT-330, une molécule inhibant CRM1 de façon très similaire au LMB mais ne présentant pas d'hépatotoxicité, sont actuellement sous étude dans des essais cliniques de stade 1 et 2 (NCT03095612, NCT01607905, NCT02227251). Les mécanismes d'action

moléculaires proposés pour expliquer l'efficacité du LMB sont mal élucidés et particulièrement peu étudiés dans le contexte des cancers gynécologiques. Les démonstrations les plus importantes semblent expliquer la capacité du LMB à induire la mort cellulaire spécifiquement dans les cellules cancéreuses par la cessation de l'exportation nucléaire de p53 [353], permettant sa stabilisation par l'inhibition de sa dégradation et son interaction facilitée avec ses cibles transcriptionnelles [354-358]. Qui plus est, l'utilisation du LMB semble synergisée par une thérapie génique concomitante permettant l'expression de p53 dans les cancers oesophagiens [359]. Des données sont aussi disponibles à l'effet que le LMB induirait l'apoptose des cellules de cancers prostatiques de façon dépendante à p53 et que l'expression d'une forme mutée de p53 pourrait potentialiser cet effet dans les cellules du cancer pulmonaire [346, 348]. Parallèlement, les cellules de cancer du col de l'utérus positives pour le HPV semblent sensibilisables à l'action du cisplatine par l'utilisation simultanée du LMB, un effet qui apparaît comme dépendant de p53 [347]; ces résultats sont renforcés par la notion que l'inhibition de l'export nucléaire de p53 phosphorylé en thr55 par le LMB, translocalisation opérée par CRM1, était responsable de la sensibilisation des cellules cancéreuses aux dommages à l'ADN [360]. Considérant le rôle crucial de CRM1 dans l'exportation nucléaire de p53 dans tous les types cellulaires, il apparaît juste de poser l'hypothèse que cette protéine est en grande partie responsable de l'effet tumoricide obtenu par l'inhibition de la machinerie de translocation nucléocytoplasmique. Toutefois, une autre protéine retient notre attention de par son émergence récente dans la littérature, sa capacité d'induction apoptotique spécifique aux cellules cancéreuses, l'incidence exceptionnellement faible de mutation dans son gène codant et la nécessité plausible de sa localisation nucléaire afin d'agir comme suppresseur de tumeur. Cette protéine, Par-4, s'est retrouvée au cœur de plusieurs de nos démarches scientifiques.

1.6.4 Par-4

La protéine de réponse apoptotique de la prostate-4 (Prostate apoptosis response-4; Par-4) est une protéine suppresseuse de tumeur issue du gène PAWR et ayant l'habilité d'induire l'apoptose sélectivement dans les cellules transformées et épargnant, selon la majorité des informations disponibles à ce jour, presque entièrement les cellules saines et même immortalisées [361-363]. Ce type d'effet est évidemment très pertinent dans le contexte d'une thérapie antitumorale ciblée, car on pourrait s'attendre à ce que les stratégies thérapeutiques s'appuyant sur l'action de Par-4 épargne les cellules normales du corps, ce qui se traduit par des effets secondaires diminués. Par-4 a d'abord été détecté dans un criblage évaluant les l'induction de protéines non-répertoriées dans les cellules de cancers prostatiques entrant en apoptose; plusieurs candidats ont été identifiés et c'est de là que la quatrième candidate tira son nom, à savoir prostate apoptosis response-4 [364]. Toutefois, l'expression de Par-4 n'est pas limitée aux tissus prostatiques mais semble bien observable à travers tous les types cellulaires, avec un niveau d'expression particulièrement élevé dans les tissus gynécologiques (Fig. 1.17).

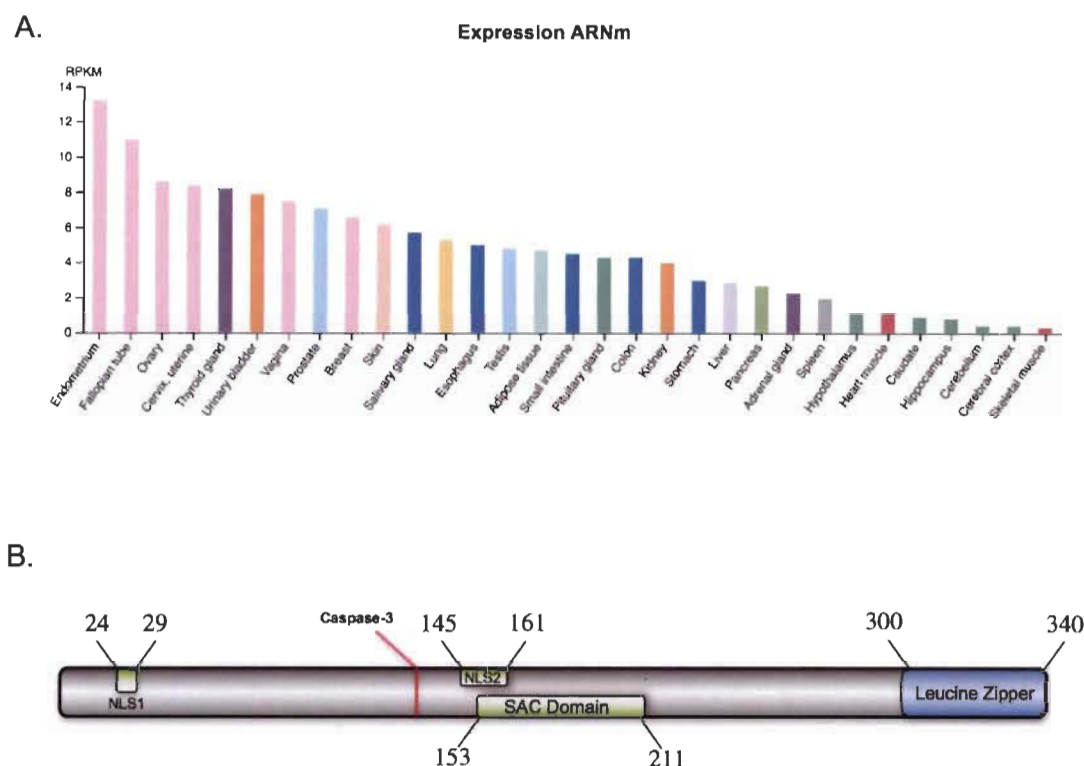


Figure 1.17

Expression et structure de la protéine Par-4

(A) Histogramme de l'expression relative de l'ARNm de la protéine Par-4. Les bandes roses représentent les tissus gynécologiques. (Adapté de The Human Protein Atlas) (B) Structure schématique de la protéine Par-4 montrant ses deux motifs consensus de localisation nucléaire (NLS), son site de clivage par la caspase-3, son domaine sélectif pour l'induction de l'apoptose (SAC) et son leucine zipper, domaine à travers lequel Par-4 pourrait interagir avec l'ADN ou d'autres partenaires protéiques.

Notre intérêt s'est porté sur Par-4 suivant la démonstration que les souris knockout pour Par-4 développaient une hyperplasie endométriale dans 80% des cas; qui plus est, la même étude rapportait que 36% de ces femelles se verraient touchées d'un adénocarcinome endométrial après 1 ans de vie [365]. Ces données frappantes suscitent évidemment un questionnement quant au rôle de Par-4 dans la régulation de la tumorigénèse endométriale. L'hyperplasie et l'apparition de cancers, couplé à l'expression prééminente de Par-4 dans les tissus gynécologiques, suggèrent une action spécifique de cette protéine dans la régulation de la croissance des cellules du tract

reproducteur féminin. Plusieurs études ont montré la capacité de Par-4 de potentialiser l'efficacité de diverses molécules chimiothérapeutiques, renversant parfois la chimiorésistance retrouvée dans certains types cellulaires [366-369] et dans des xénogreffes murines [370, 371]. Toutefois, afin qu'une cible proapoptotique soit jugée pertinente, il est nécessaire de s'assurer de sa fonctionnalité dans les cellules transformées. L'une des caractéristiques permettant de croire que Par-4 revêt un potentiel thérapeutique important tient dans le faible pourcentage de mutations subit par son gène codant. À travers toutes les études de séquençage à haut débit disponibles sur TCGA, on retrouve un taux d'altération génétique oscillant entre 1.7% et 1% (Fig. 1.18).

Toutefois, la faible expression de Par-4 apparaît comme un facteur pronostique négatif, les tumeurs présentant de faibles niveaux de Par-4, ou son absence complète, étant généralement plus résistantes aux thérapies en plus d'être plus agressives [362, 367, 368, 372-374]. Cette expression diminuée n'est pas issue de délétion majeure ou du troncage de la protéine par mutation faux-sens. En effet l'expression et l'activité de Par-4 semble plutôt abrogée à travers deux mécanismes, soit le silençage génique et la modification post-traductionnelle; ces deux mécanismes, plausiblement, seraient donc réversibles. Tout d'abord, un hyperméthylation du promoteur de Par-4, un effet dépendant partiellement de la voie des MAPK, a été constaté dans plusieurs modèles et a été suggérée comme étant responsable d'une inhibition de la transcription de Par-4 et, implicitement, de son expression [375-377]. Toutefois, des données récentes remettent en question ces résultats, suggérant que l'incidence la méthylation du promoteur de Par-4 ne semble pas aussi élevé que rapporté ou encore que cette méthylation ne se traduit pas par une réduction de niveaux d'expression de la protéine [378, 379]; qui plus est, cette expression diminuée ne semble pas observable dans le cas du cancer ovarien, alors qu'on rapporte une expression semblable de Par-4 entre les tissus tumoraux et normaux [366]. Finalement, l'étude de 2007 pilotée par Moreno-Bueno portant sur la diminution de l'expression de Par-4 dans les cas de cancers endométriaux incluait une étude immunohistochimique regroupant 100 tissus; au final, près de 40% des tumeurs endométriales étudiées semblaient négatives pour l'expression de Par-4. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés dans d'autres études similaires [380]. En somme, l'expression de Par-4, dans les cancers, apparaît

comme régulé par divers mécanismes encore mal disséqués et l'hétérogénéité des résultats, changeants en fonction du grade et des tissus à l'étude, montre bien l'incertitude entourant les mécanismes de régulation de l'expression de Par-4.

Parallèlement, plusieurs modifications post-traductionnelles survenant sur Par-4 semblent régir sa localisation intracellulaire. D'une part, Par-4 pourrait agir à titre de facteur de transcription via son domaine amino-terminal riche en leucines, aussi appelé leucine zipper. Ce dernier, tel qu'expliqué plus loin, permet aussi l'interaction de Par-4 avec des protéines partenaires. Alors que plusieurs théories mécanistiques expliquant la capacité de cette protéine à induire l'apoptose s'entrechoquent, certaines se dégagent plus robustement de la littérature. D'une part, plusieurs démonstrations suggèrent la nécessité de la localisation nucléaire de Par-4 pour induire la mort cellulaire et l'essentialité de son domaine central, le domaine SAC, dans cet effet [381-384]. La translocation nucléaire de Par-4 semble entravée par la phosphorylation de cette dernière sur la sérine 249 par la protéine Akt1, un mécanisme putatif de résistance [385]. Accessoirement, l'inhibition de Par-4 semble aussi impliquée dans la résistance au cisplatine, un effet médié par l'effet inhibiteur possible de Par-4 sur l'activité voie PI3K/Akt[368]. Additionnellement, la phosphorylation de Par-4 par PKA sur la thréonine 163 semble nécessaire à sa capacité à induire l'apoptose dans certains types cellulaires, notamment des cellules cancéreuses prostatiques et des fibroblastes murins; cette phosphorylation, toutefois, ne favorise pas la localisation nucléaire de Par-4 mais potentialise seulement son action une fois au sein de ce compartiment. Ce mécanisme a été proposé comme étant sélectif en fonction de l'activité décuplée de PKA dans les cellules cancéreuses, un lien ténu nécessitant confirmation [386]. On explique l'effet proapoptotique de la localisation nucléaire de Par-4 par sa capacité d'inhiber l'expression de Bcl-2, possiblement via l'inhibition de la voie NF- κ B [372, 387, 388]; un mécanisme alternatif, mettant en cause la liaison directe de Par-4 à un site consensus pour la protéine WT1 présent sur le promoteur de Bcl-2, a aussi été proposé dans les cellules endométriales [383]. Anecdotiquement, dans le cas du cancer endométrial, alors que près de 40% des tumeurs n'exprimaient pas la protéine, c'est plutôt 90% des cellules positives pour Par-4 qui présentaient un phénotype d'exclusion nucléaire

complet, soulignant l'importance potentielle de cet événement dans le processus tumorigène [375].

Notre laboratoire a démontré que Par-4 pouvait être clivé par la caspase-3 lors de l'induction initiale de l'apoptose [389]. De surcroît, cette forme tronquée de Par-4 semble suffisante pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses; ces résultats sont en phase avec les données précédemment publiées montrant la nécessité unique du NLS2 et du domaine central SAC dans la capacité de Par-4 à induire la mort cellulaire [384]. Toutefois, ce même article stipulait que le leucine zipper ne semblait pas important dans l'activité proapoptotique de Par-4, un résultat en opposition directe avec des données démontrant que ce domaine d'interaction protéique permettait l'amarrage de Par-4 avec WT1 et que cette interaction est nécessaire à l'effet sensibilisant octroyé par Par-4; de façon encore plus intéressante, l'expression ectopique concomitante du domaine leucine zipper avec la forme longue de Par-4 abrogeait complètement la capacité de Par-4 à sensibiliser des cellules à un agent chimiothérapeutique, suggérant une forme d'autorégulation inhibitrice [390]. Finalement, d'autres démonstrations suggéraient que Par-4 soit capable d'induire l'apoptose dans certains types de cellules de cancer endométriale mais aurait aussi une fonction alternative, dépendant du contexte tissulaire, qui lui permettrait d'agir de concert avec NF- κ B, stimulant sa localisation nucléaire et son programme transcriptionnel; ce processus, évidemment, semble en contradiction absolue avec les résultats obtenus dans d'autres tissus [380]. Le rôle du leucine zipper semble donc encore entouré d'une confusion importante et l'équilibre entre les diverses formes de Par-4, longue et clivée, pourrait être la clé expliquant la fonction particulièrement sibylline de cette protéine dans les tissus gynécologiques.

Il m'apparaît capital de mentionner, à la lumière de ce chapitre, que les démonstrations associées aux mécanismes moléculaires entourant l'induction de l'apoptose élicitee par Par-4 et sa localisation cyto-nucléaire émanent presque entièrement de modèles cellulaires pancréatiques et prostatiques. Le rôle de Par-4 et les processus qui lui sont associés semblent revêre une complexité singulières, la faible concordance des résultats disponibles, en plus de l'éparpillement et de l'hétérogénéité des modèles,

permettent de croire qu'il est vain de penser qu'un mode d'action unifié sera facilement identifié et que c'est plutôt un réseau de régulation distinct qui de dégagera d'efforts de recherches plus approfondis.

1.7 Problématique et objectifs de la recherche

Les tissus gynécologiques sont hautement dynamiques et les mécanismes de régulations permettant le maintien de leur homéostasie sont complexes. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR occupe une place particulièrement centrale dans ces processus homéostatiques; sa place quasi souveraine de modulateur du destin cellulaire fait de cet axe signalétique une pierre angulaire moléculaire autant dans les processus physiologiques que pathologiques. Étudier les fondements mécanistiques de ce sentier de signalisation semble donc pertinent afin d'à la fois pleinement caractériser le rôle physiologique de ces protéines en plus de s'appuyer sur ces résultats pour identifier des avenues thérapeutiques nouvelles pour lutter contre certaines pathologies affligeant l'appareil reproducteur féminin.

D'une part, notre travail s'est d'abord concentré sur la dissection du rôle distinct des isoformes d'Akt dans le processus de décidualisation, un mécanisme moléculaire mettant en place une transformation cellulaire s'apparentant à la transition mésenchymale-épithéliale. Nous nous sommes donc penchés sur l'effet de la décidualisation, induite expérimentalement par l'utilisation concomitante de MPA, un analogue de la progestérone, et de 8-bromo-cAMP, une molécule d'AMPc pouvant perméabiliser la membrane plasmique; nous avons aussi choisi d'utiliser des cellules HIESC, un modèle mimant plus pertinemment le contexte physiologique. En effet, alors qu'un nombre très réduit d'informations était disponible à l'effet que la phosphorylation d'Akt semblait opposer l'expression de marqueurs déciduaux, ces résultats émergeaient de l'utilisation de cellules endométriales d'origine endométriotiques, présentant potentiellement des altérations dans la voie PI3K/Akt [146]. Les cellules HIESC, pour leur part, ne proviennent pas d'un tissu touché par cette pathologie. De plus, aucune information n'était disponible quant au rôle spécifique de chacun des isoformes, une donnée d'une

importance capitale en vue de la non-redondance fonctionnelle de chacun d'entre eux mis au jour par une multitude d'expériences animales. Nous avons donc décidé de tenter d'évaluer le rôle de chacun des isoformes d'Akt dans l'induction du programme décidal (Fig. 1.19). Finalement, cette information aura des retombées importantes qui permettront de guider nos expériences futures impliquant des modèles de souris knockout pour chaque isoforme, et ce, spécifiquement dans les tissus gynécologiques.

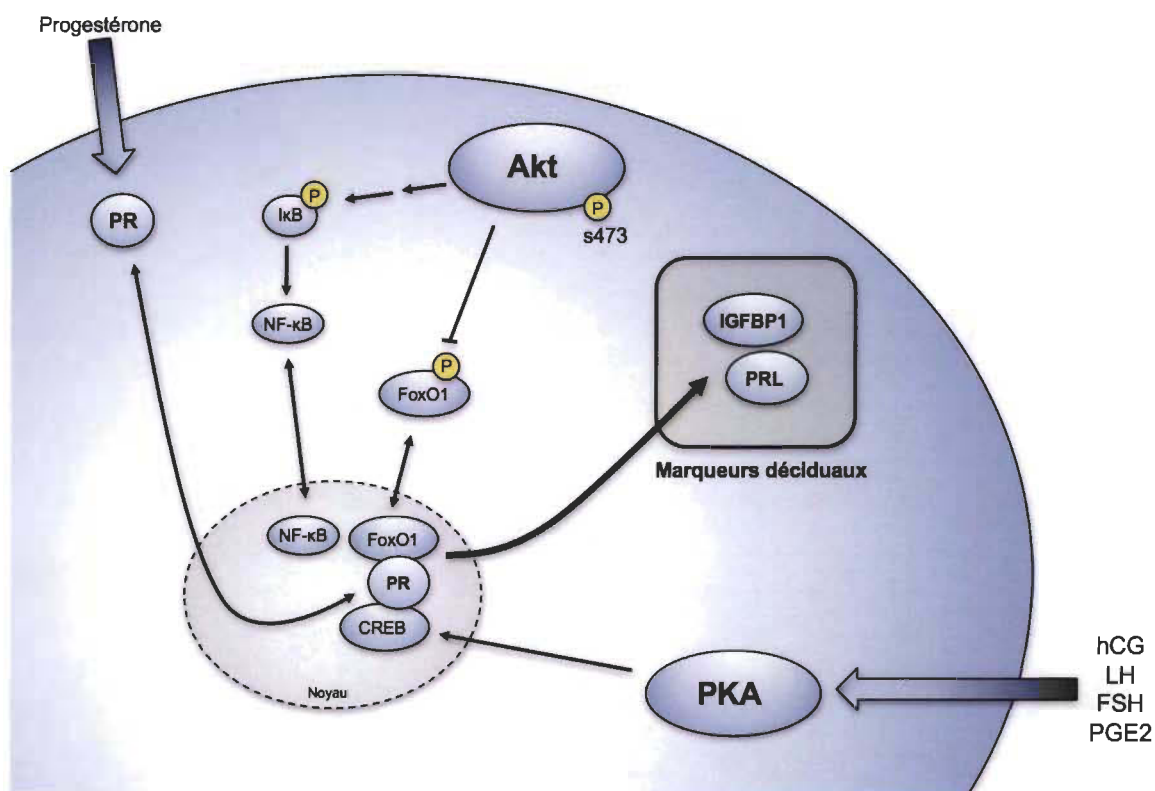


Figure 1.19 Représentation sommaire des voies de signalisation entourant notre hypothèse de recherche quant au rôle d'Akt dans la décidualisation

Par la suite, notre intérêt s'est porté sur le rôle d'une protéine récemment décrite dans notre laboratoire comme étant une cible de la caspase-3, à savoir la protéine Par-4. Des résultats dans des lignées cellulaires dérivés de plusieurs tissus ayant suggéré la capacité pro-apoptique robuste et hautement spécifique de Par-4, nous nous sommes intéressés à la place de Par-4 dans l'induction du suicide cellulaire dans le contexte gynécologique. Nos premiers résultats, obtenus dans les cellules HeLa, suggéraient que la surexpression de Par-4 permettait une sensibilisation modeste des cellules au cisplatine; toutefois, la surexpression de la forme clivée de Par-4 permettait une induction plus

robuste de la mort cellulaire [389]. Nous nous sommes donc penchés sur le rôle de la surexpression de la forme longue de Par-4 dans certains modèles gynécologiques et n'avons pas réussi à observer l'induction directe de l'apoptose, tel que décrit dans d'autres modèles; des résultats préliminaires ont montré, toutefois, que la surexpression de Par-4 modifiait la morphologie cellulaire. Nous avons donc entrepris d'évaluer le rôle de Par-4 dans la transition épithéliale mésenchymale afin de déterminer si cette protéine revêtait un potentiel transformatif sur les cellules. La voie du TGF- β étant l'une des mieux caractérisées comme inductrice de l'EMT, nos expériences se sont concentrées sur le lien entre ce sentier signalétique et la capacité de Par-4 à induire une transformation de type épithéliale-mésenchymale. Nos résultats ont révélé la capacité de Par-4 à induire l'EMT à travers la stimulation de l'expression de plusieurs facteurs de transcription pro-EMT et ont précisé la place de Par-4 comme intermédiaire signalétique dans la voie du TGF- β . Finalement, la protéine XIAP apparaît comme étant une protéine charnière dans la potentialisation de l'activité pro-EMT de Par-4.

Notre attention s'est ensuite concentrée sur les processus de chimiorésistance des cancers ovariens et endométriaux. Originellement, Par-4 aurait été un candidat idéal, le contrôle de son expression, de son clivage et de sa localisation permettant la resensibilisation des cancers chimiorésistants aux molécules inductrices d'apoptose. Toutefois, les données obtenues précédemment montraient que Par-4 n'exerçait pas globalement le même effet que décrit dans d'autres systèmes cellulaires; l'une des explications possibles était l'exportation nucléaire anormalement élevée dont pourrait faire l'objet le fragment clivé de Par-4 dans les cancers gynécologiques. Cette hypothèse nous a poussés à évaluer d'autres stratégies thérapeutiques potentielles, usant de façon concomitante des inhibiteurs ciblés de concert avec des molécules chimiothérapeutiques. Nous nous sommes donc intéressés à un acteur de la dynamique de transport cytonucléaire, CRM1, dont l'expression semblait associée à l'augmentation de la chimiorésistance chez les patientes, en plus d'être associée à un mauvais pronostique. Nous avons évalué la capacité d'un inhibiteur de cette navette protéique, la leptomycine B, à potentialiser l'action d'un inducteur de l'apoptose par voie intrinsèque et extrinsèque.

De plus, nous avons tenté de caractériser les mécanismes moléculaires permettant la sensibilisation et l'action apoptotique synergique observée dans nos expériences.

Finalement, en parallèle de nos expériences portant sur l'inhibition de l'exportation nucléaire, nous avons conduit des expériences afin d'explorer, encore une fois, l'hypothèse que l'action combinée de molécules ciblées et d'agents chimiothérapeutiques potentialiserait la capacité tumoricide de ces derniers. Étant donnée la place centrale occupée par les altérations de la voie PI3K/Akt dans tous les cancers, en plus de leur rôle particulièrement saillant dans le contexte des cancers gynécologiques, l'inhibition de cette voie de signalisation semblait une méthode intéressante pour amplifier l'efficacité des molécules chimiothérapeutiques. Dans ce contexte, toutefois, nous avons préféré utiliser des médicaments couramment prescrits en clinique afin d'augmenter le potentiel translationnel de notre étude. Plusieurs molécules inhibitrices, à savoir le NVP-BEZ235 et l'AZD5363, ont été combinés à la doxorubicine et au cisplatine; nous avons par la suite identifié les combinaisons les plus efficaces et caractérisé certains mécanismes moléculaires sous-tendant cet effet de sensibilisation. Un résumé schématique des voies de signalisation étudiées se retrouve en figure 1.15.

Les hypothèses principales qui sont explorées dans cette thèse sont les suivantes :

- 1) La kinase Akt s'oppose à l'induction de la décidualisation, et ce, de façon isoforme spécifique.
- 2) La protéine Par-4 pourrait agir comme un inducteur de la mort cellulaire; cette capacité dépend de sa localisation nucléaire et de son état de clivage.
- 3) Certains mécanismes, comme par exemple l'extrusion nucléaire effectuée par CRM1, permettent l'établissement de la chimiorésistance par l'inactivation fonctionnelle de certaines protéines. Inhiber ce mécanisme pourrait sensibiliser les cellules à des signaux apoptotiques, intrinsèques comme extrinsèques.
- 4) La kinase Akt joue un rôle charnière dans le processus de chimiorésistance et interférer avec sa signalisation revêt un potentiel thérapeutique important.

En somme, nous avons procédé à une caractérisation approfondie de plusieurs processus physiologiques et pathologiques et avons précisé l'influence de plusieurs voies de signalisation, principalement PI3K/Akt/mTOR, dans ces contextes. Nous avons aussi entrepris de dévoiler une association possible entre la dysfonction, principalement par suractivation, de ces voies et l'effet dichotomique de Par-4 observé dans nos modèles d'étude. Nos résultats permettent, potentiellement, de jeter les bases pour l'élaboration de thérapies combinatoires présentant une spécificité et une efficacité tumoricide accrues; ces thérapies, développée de façon cohérente et rationnelle, s'appuient sur des dérégulations fondamentales émergeant d'un processus tumorigène plausiblement universel.

CHAPITRE II

PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE-4 MEDIATES TGF- β -INDUCED EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION

Parvesh Chaudhry, **François Fabi**, Mohan Singh, Sophie Parent, Valérie Leblanc, Eric Asselin

Prostate apoptosis response-4 mediates TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition

Cell Death and Disease (2014) 5, e1044; doi:10.1038/cddis.2014.7

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue Cell Death and Disease le 6 février 2014. François Fabi et Parvesh Chaudhry on agit comme co-premier auteur lors de la publication de cet article, tel qu'indiqué dans le manuscrit. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs.

2.1 Contribution des auteurs

François Fabi et Parvesh Chaudhry, stagiaire post-doctorale, on effectué, en majorité, la conception de l'étude, la réalisation des expérimentations. François Fabi a effectué la majorité de la rédaction du manuscrit. Mohan Singh, stagiaire post-doctoral, à réaliser certaines expériences, principalement celles concernant la motilité cellulaire et la microscopie. Valérie Leblanc et Sophie Parent, assistantes de recherche, ont fait plusieurs manipulations et aidé à la mise au point de protocoles. Eric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et a supervisé l'élaboration et la conception expérimentale de ce manuscrit.

2.2 Résumé de l'article

Une quantité croissante d'information supporte l'idée que la transition épithéliale-mésenchymale (la TEM), qui survient lors du développement et de la progression oncogénique, possède un rôle crucial dans la métastase en augmentant les capacités de

motilité des cellules tumorales. Le transforming growth factor- β (TGF- β) est une cytokine capable d'induire la TEM dans plusieurs types de cellules cancéreuses; toutefois, les mécanismes expliquant ce processus ne sont pas, à ce jour, entièrement clarifiés. Une compréhension plus complète de ce type de phénomènes est charnière dans notre conception des processus physiologiques tout comme pathologiques régissant les tissus gynécologiques.

Dans cette étude, nous avons démontré que le TGF- β augmente l'expression d'un suppresseur de tumeur nommé Par-4 et que cette augmentation se produit de concert avec l'induction de la TEM. Nos résultats montrent que, lorsque soumises aux trois isoformes distincts du TGF- β , les cellules cancéreuses exhibent une augmentation marquée de l'expression de l'ARNm de Par-4 de concert avec la phosphorylation de Smad2 et I κ B α . A contrario, l'utilisation d'un inhibiteur d'ALK5, d'un anticorps neutralisant le TGF- β ou un inhibiteur de PI3K réduisent tous les niveaux protéiques de Par-4, ce qui suggère que la voie de signalisation des Smad et de NF- κ B sont impliquées dans le contrôle exercé par le TGF- β sur l'expression de Par-4. Plusieurs équipes ont déjà identifié des sites de liaison de NF- κ B sur l'ADN; toutefois, en utilisant une technique d'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons montré l'existence d'un site de liaison pour Smad4 dans le promoteur de Par-4. En outre, nos résultats suggèrent que le TGF- β permet la localisation nucléaire de Par-4. De façon fort intéressante, une exposition prolongée au TGF- β 3 modifie la morphologie épithéliale des cellules à l'étude, en plus d'augmenter leur motilité et d'induire l'expression de Snail, Vimentine, ZEB1 et N-Cadherine, des marqueurs classiques de la TEM. Finalement, l'augmentation forcée des niveaux protéiques de Par-4 par l'utilisation de vecteurs d'expression a provoqué la hausse de Vimentine et de Snail, en plus de stimuler la motilité cellulaire, un phénomène abrogé par l'utilisation de siRNA dirigés contre Par-4. Finalement, nous avons identifié le rôle crucial de XIAP dans la régulation du clivage de Par-4 par les caspases et, de ce fait, dans le contrôle des niveaux de sa forme longue.

En conclusion, nos résultats suggèrent que Par-4 agit comme une cible essentielle du TGF- β et régit partiellement sa capacité à induire la TEM. De plus, le contrôle exercé par XIAP sur le clivage de Par-4 apparaît comme charnière pour déterminer le rôle de ce dernier; ces mécanismes pourraient expliquer la transition du TGF- β d'un suppresseur de tumeur vers un oncogène puissant et serviront à établir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'effet pléiotropique du TGF- β sur les cellules humaines.

2.3 Article complet (anglais) : Prostate apoptosis response-4 mediates TGF- β - induced epithelial-to-mesenchymal transition

Abstract

A growing body of evidence supports that the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which occurs during cancer development and progression, has a crucial role in metastasis by enhancing the motility of tumor cells. Transforming growth factor- β (TGF- β) is known to induce EMT in a number of cancer cell types; however, the mechanism underlying this transition process is not fully understood. In this study we have demonstrated that TGF- β upregulates the expression of tumor suppressor protein Par-4 (prostate apoptosis response-4) concomitant with the induction of EMT. Mechanistic investigations revealed that exogenous treatment with each TGF- β isoform upregulates Par-4 mRNA and protein levels in parallel levels of phosphorylated Smad2 and I κ B- α increase. Disruption of TGF- β signaling by using ALK5 inhibitor, neutralizing TGF- β antibody or phosphoinositide 3-kinase inhibitor reduces endogenous Par-4 levels, suggesting that both Smad and NF- κ B pathways are involved in TGF- β -mediated Par-4 upregulation. NF- κ B-binding sites in Par-4 promoter have previously been reported; however, using chromatin immunoprecipitation assay we showed that Par-4 promoter region also contains Smad4-binding site. Furthermore, TGF- β promotes nuclear localization of Par-4. Prolonged TGF- β 3 treatment disrupts epithelial cell morphology, promotes cell motility and induces upregulation of Snail, vimentin, zinc-finger E-box binding homeobox 1 and N-Cadherin and downregulation of Claudin-1 and E-Cadherin. Forced expression of Par-4, results in the upregulation of vimentin and Snail expression together with increase in cell migration. In contrast, small interfering RNA-mediated silencing of Par-4 expression results in decrease of vimentin and Snail expression and prevents TGF- β -induced EMT. We have also uncovered a role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in the regulation of endogenous Par-4 levels through inhibition of caspase-mediated cleavage. In conclusion, our findings suggest that Par-4 is a novel and essential downstream target of TGF- β signaling and acts as an important factor during TGF- β -induced EMT.

Introduction

In humans, majority of the solid tumors originate from epithelial cells. The invasive nature of each tumor depends on the migration capacity of epithelial cells, which they acquire via a process known as the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)¹. EMT is a complex process in which epithelial cells acquire mesenchymal cell-like properties through changes in cell morphology, cell–cell and cell–matrix adhesion, transcriptional regulation and migration capacity^{2,3}. Members of the transforming growth factor- β (TGF- β) family have been identified as important inducers of EMT during development as well as carcinogenesis^{4,5}.

TGF- β is secreted by many cells types⁶⁻⁸ and directly stimulates the cellular production of extracellular matrix and microenvironment molecules in both normal and cancer cells⁹⁻¹¹. The growth inhibitory properties of TGF- β have been appreciated for a long time. Indeed, several studies have shown that during early stages of carcinogenesis, TGF- β acts as a tumor suppressor principally through its ability to promote cell cycle arrest or apoptosis¹². However, when the tumor progresses, TGF- β shifts its role from tumor suppressor to tumor promoter, inducing neoplastic cell invasiveness and metastasis through EMT and via its reprogramming of cell microenvironments¹³⁻¹⁴. EMT is characterized by the down-regulation of the expression of epithelial markers such as E-cadherin, which is critical in mediating epithelial cell integrity and cell–cell adhesion¹⁵ and the upregulation of mesenchymal markers N-cadherin, which has been linked to elevated cell motility and invasive phenotype^{1,3}. TGF- β stimulation of EMT is mostly achieved through its ability to induce the expression of the Snail/ZEB family of basic helix–loop–helix transcription factors, including that of Snail1, zinc-finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), Snail2/Slug, Twist and ZEB2/SIP1^{2,4,15,16}. In light of its role as a master regulator of EMT, TGF- β stimulus also upregulates the expression of intermediate filament protein vimentin, which is known to be expressed in all primitive cell types, but not in their differentiated counterparts¹⁷. In spite of all these studies, much remains to be determined regarding the molecular and genetic events involving TGF- β in the induction of EMT.

The effects of TGF- β are mediated by three TGF- β ligands, TGF- β 1, - β 2 and - β 3. On ligand binding, TGF- β type I and II receptor form tight complexes leading to the recruitment and phosphorylation of Smad2 and Smad3¹⁸. Phosphorylated Smads associate with cytoplasmic Smad4 and the complex then translocates to the nucleus to control transcription of target genes¹⁹. In addition to Smads, TGF- β also signals through a variety of Smad-independent signaling systems, including (a) the MAP kinases (ERK1/ERK2, p38 MAPK and JNK) and (b) the survival kinases phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt. In a process to delineate the role of TGF- β signaling in cancer progression and invasion, we have identified novel targets of TGF- β signaling in normal and cancer cells^{17,20} and the list is still expanding. In the present study, we have found prostate apoptosis response-4 (Par-4) as a novel target of TGF- β signaling.

Par-4 is a pro-apoptotic, tumor suppressor protein, which is expressed ubiquitously in various tissue types, and resides in both the cytoplasm and the nucleus²¹. Consistent with its tumor suppressor role, Par-4 is shown to be downregulated in many cancers²²⁻²⁴. Overexpression of Par-4 selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal or immortalized cells^{21,25}. Low expression of Par-4 has been reported in terminally differentiated cells suggesting that Par-4 is downregulated during differentiation (reviewed in Zhao et al.²⁶). However, beyond these suggestive lines of evidence, the involvement of Par-4 in EMT remains to be explored. We have previously reported that Par-4 is a direct substrate of caspase-3, which cleaves it at the EEPD¹³¹↓G non-canonical cleavage site; the resulting fragment retains its apoptosis inductive capabilities. One of the most potent caspases activity inhibitor is the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). XIAP is a member of the IAP family, which is composed of intracellular pro-survival proteins that share structural and functional similarities. The pro-survival role of XIAP has been well established and amply characterized. Its activation leads to the inhibition of caspases 3, 7 and 9, severely impairing cells ability to enter apoptosis.

Here we report for the first time a novel role of Par-4 during TGF- β -induced EMT in endometrial and cervical cancer cells. In the first part of the study, we unraveled that

Par-4 is a transcriptional target of TGF- β and is upregulated during EMT. A novel Smad4-binding site has been identified in the Par-4 promoter region. Furthermore, overexpression of Par-4 results in the upregulation of Snail and vimentin expression, change in cell morphology and increase in cell migration. In contrast, small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of Par-4 decreases the expression of Snail and vimentin. We also demonstrated that XIAP has a pivotal role in the regulation of Par-4 protein levels and activity through the control of its caspase-mediated cleavage. Our findings suggest that TGF- β targets Par-4, which has a crucial regulatory role during cellular differentiation and EMT.

Materials and methods

Cell lines and reagents.

Human endometrial carcinoma cell lines, KLE and Hec-1-A, human cervical cancer cell line, HeLa, human ovarian adenocarcinoma cells, SKOV-3 and human breast luminal adenocarcinoma, MCF7, were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Hiesc cells were obtained from Michel A Fortier, Université Laval.⁴⁹ Primary MEFs derived from XIAP β/β and XIAP $+/+$ mice. All the antibodies were obtained from Cell Signaling technology (Danvers, MA, USA) except for anti-TGF- β neutralizing antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-rabbit secondary antibody (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Recombinant TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). PI3K inhibitor, LY294002 and MEK inhibitor, U0126 were obtained from Cell Signaling Technology. Cisplatin and Alk5 inhibitor, SB431542 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Treatments and transfections with constructs and siRNA.

Cells were seeded in 6-well plates and after 24h, medium was replaced with fresh media containing appropriate treatment (TGF- β s, neutralizing TGF- β antibody, PI3k inhibitor, MEK inhibitor and/or Alk5 inhibitor).

Par-4 (pCMV entry-Par-4-Myc-DDK) and empty vector (pCMV entry-Myc-DDK) plasmids encoding a Myc tag at the C terminus were purchased from Origene (Rockville, MD, USA). XIAP constructs WT (Myc6-XIAP WT) and mutant (Myc6-XIAP-H467A, E3 ligase inactive mutant) were a kind gift from Dr. Herman H Cheung (Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada). TGF- β 3 plasmid was cloned in our lab in pcDNA3.1/V5-His TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). One day before transfection, cells were plated at 3×10^5 per well in 6-well plates to achieve a confluency of B70% after 24 h. Cells were transfected with 1–2mg of expression vector using Eugene 6 (Roche, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. Plates were incubated for 48 h at 37 °C before cells were collected and subjected to further analysis.

For silencing of Par-4, XIAP, p65 and Smad4 expression, cells were seeded in 6-well plates (B3 105 cells per well) and after 24 h cells were transiently transfected with 50nM (100nM for XIAP and Smad4) Par-4/XIAP/p65-specific/ Smad4 siRNA or control nonsilencing siRNA (Santa Cruz Biotechnology) using TransIT-TKO transfection reagent (Mirus, Madison, WI, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Plates were incubated for 48 h before cells were collected for further analysis.

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR).

Following TGF- β treatment, total RNA was isolated from the cells using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed using

Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo (dT) primers. The reverse-transcribed RNA was then amplified by PCR using specific primers against Par-4 and GAPDH as described previously³⁷. The PCR products obtained were electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized using SYBR- Safe (Invitrogen) staining.

Western blot analysis.

After the end of the treatment period or transfection time, both floating and attached cells were collected and cell lysate was done using cold radioimmunoprecipitation assay lysis buffer containing protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), followed by three freeze–thaw cycles. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared from the cells using NE-PER reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). Proteins were measured using the Bio-Rad DC protein assay. Western blotting was performed as described³⁷. Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies were used, and the blot was developed using SuperSignal West Femto substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), as described by the manufacturer.

Immunofluorescence microscopy analysis.

Cells treated with growth factors or transfected with appropriate plasmids as described above were grown in 6-well plates containing sterile coverslips. On the day of analysis, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized for 10 min using 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate at room temperature. After being blocked with Dako blocking serum for 1 h, cells were incubated with primary antibody (1 : 100 dilution) or isotypic control antibody for 1 h. After incubation with primary antibody, cells on the coverslips were washed three times with PBS and then incubated with fluorescent-tag-conjugated secondary antibodies (1 : 200 dilution) for 30 min in dark. In some experiments, Rhodamine–phalloidin, which stains the actin cytoskeleton, is used to visualize the shape and integrity of the cells. Cells were counterstained with Hoechst 33248 (0.25mg/ml) for 5min, and slides were mounted using Slowfade gold antifading reagent (Invitrogen) and viewed under a Carl Zeiss Axio observer Z1 microscope.

Cell migration and wound healing assay.

The motility and invasive ability was evaluated using 8-mm pore size transwell inserts, which were coated with 2mg/ml matrigel. Cells were transfected with 2mg of empty or Par-4 plasmids. After 48h, cells were trypsinized, resuspended in respective basal medium without serum and 2 × 10⁵ cells were seeded in the upper chamber inserts. The lower chambers were filled with 600 ml of respective culture medium with 10% FBS. After 24 h, migration assay was terminated by removing the cells from the upper chamber of the filter. Cells that had invaded through the matrigel and adhered to the lower surface of the filter were fixed, and the nuclei were stained with Hoechst 33258 (as described above) and analyzed by fluorescence microscopy. Nuclei were counted from five different fields in each experiment.

For wound healing assay, equal numbers of cells were seeded in 6-well plates and were allowed to grow for 24 h. Cell monolayer was wounded with a plastic tip and TGF- β treatment was initiated. The migration was followed for 48h and photomicrographs were taken with the Carl Zeiss Axio observer Z1 microscope at 0, 24 and 48 h.

ChIP assay.

ChIP assays were done using an EZ CHIP kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. Following TGF- β treatment, cell lysates were made. Chromatin was sonicated to obtain fragmented DNA (100–200 bp) and immunoprecipitated with control IgG (mouse and rabbit), anti-Smad4 (Cell Signaling) or anti- RNA Polymerase II (RNAPolII) (Upstate Biotechnology). The primer pairs used for ChIP assays are P1 (Fwd 5' -GAGAGGCAGAGACAGGGT-3' ; Rev 5' -AAGAAAAC TGCGGTGCCCT-3') and P2 (Fwd 5' -ATCATGTGCTACCTGGGC-3' ; Rev 5' -CG CACCTAAGACTGACCT-3'). PCR was done as described previously³⁷.

Statistical Analysis.

Statistical analysis was done by one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test or Student's t-test where appropriate. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. All analysis was performed using GraphPad PRISM software, version 3.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

TGF- β signaling upregulates Par-4 expression.

As for other tumor types, TGF- β is also a key component of the endometrial tumor microenvironment, which regulates autocrine and paracrine signaling pathways between a tumor and its microenvironment. Endometrial cancer cell lines, KLE and Hec-1-A and cervical cancer cell line, HeLa, are commonly used as a model to study cancer cell signaling and EMT; we also used human immortalized endometrial stromal cells (Hiesc) to assess whether the observed mechanisms were applicable to normal cells in addition to the malignant context. Furthermore, we used SKOV-3 cells, an ovarian adenocarcinoma, as well as MCF7, a breast adenocarcinoma of luminal origin. This allowed us to broaden the conclusions of the study as the results we would obtain would be widely applicable to a number of gynecological cancers. As the cells used in the present study constitutively produce the precursor protein of TGF- β isoforms and express abundant levels of TGF- β receptors²⁷⁻²⁹ (Supplementary Figure S1C), they are a valuable model for studying autocrine and paracrine TGF- β signaling. It has been demonstrated that TGF- β acts as a tumor suppressor during the early stages of tumor; the mechanisms involved in these pro-apoptotic responses are diverse and cell type dependent. In the present study, we tested whether these actions of TGF- β occur through the regulation of pro-apoptotic protein Par-4. The results showed that exogenous TGF- β treatment upregulated Par-4 protein content in all the cell lines (Figure 2.1a, Supplementary Figure S1A) suggesting that the regulation of Par-4 by TGF- β is not tissue specific. In addition, TGF- β also regulates Par-4 expression at the transcript level as shown by our qRT-PCR analysis (Figure 2.1b,

Supplementary Figure S1B) strongly supporting that Par-4 could be a novel target of TGF- β signaling.

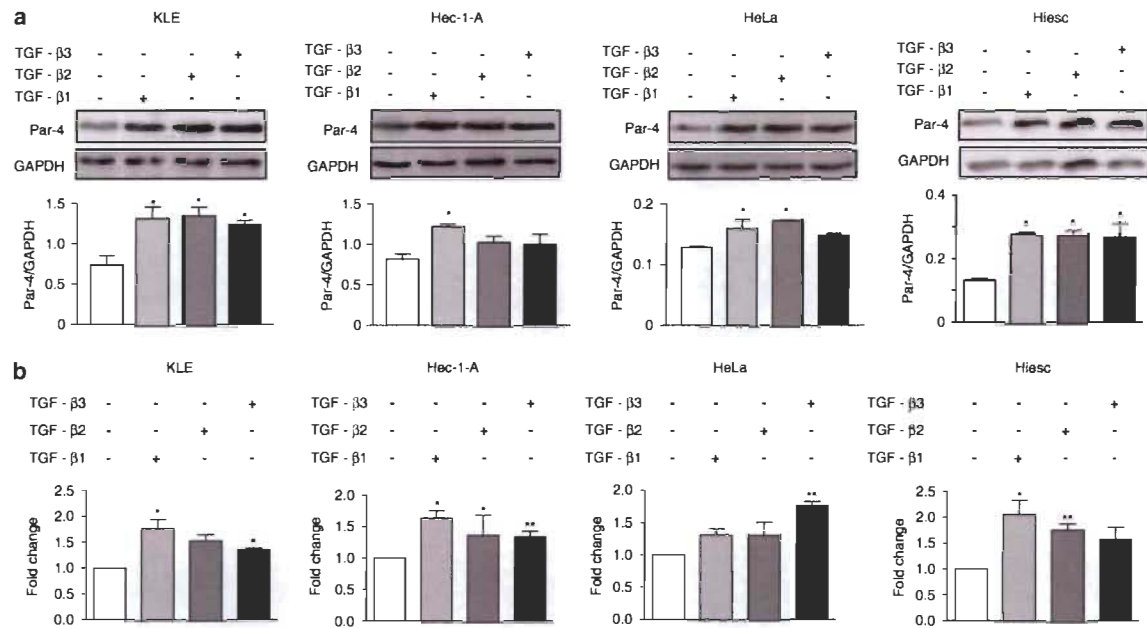


Figure 2.1 TGF- β signaling upregulates Par-4 expression.

(a) Cells were treated with different isoforms of TGF- β (10 ng/ml) for 24 h. Total proteins were extracted for western blot analysis using Par-4 antibody. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analyses of Par-4 protein levels are presented as mean \pm S.D. * P <0.05 compared with vehicle-treated cells. (b) qRT-PCR analysis of transcript levels of Par-4 after TGF- β treatment; 18s rRNA was used as the reference gene. Densitometric analyses of Par-4 transcript levels are presented as mean \pm S.D. * P <0.05, ** P <0.01 compared with vehicle-treated cells

TGF- β -mediated Par-4 upregulation occurs through both Smad-dependent and Smad-independent pathways.

TGF- β signaling occurs through canonical (Smad-dependent) and/or non-canonical (Smad-independent) pathways. Therefore, we further investigated whether TGF- β signal is predominantly delivered via Smad-dependent and/or Smad-independent pathways. Western blot analysis revealed that TGF- β treatment increased Smad2 phosphorylation (Figure 2.2a). Previously, we have shown that TGF- β upregulates XIAP through the activation of NF- κ B¹⁷. As the phosphorylation of I κ B- α leads to the activation and nuclear

translocation of NF- κ B, we thus tested whether TGF- β treatment increase I κ B- α phosphorylation. The results showed that I κ B- α is rapidly phosphorylated following TGF- β treatment (Figure 2.2b). MCF7 cells did not display increased Smad nor I κ B- α phosphorylation, suggesting that TGF- β signals through alternative pathways in these cells; this is supported by the fact that we observed increased Par-4 protein levels as well as mRNA independently from both cascade activation. These results suggest that TGF- β signals through both Smad-dependent and Smad-independent pathways.

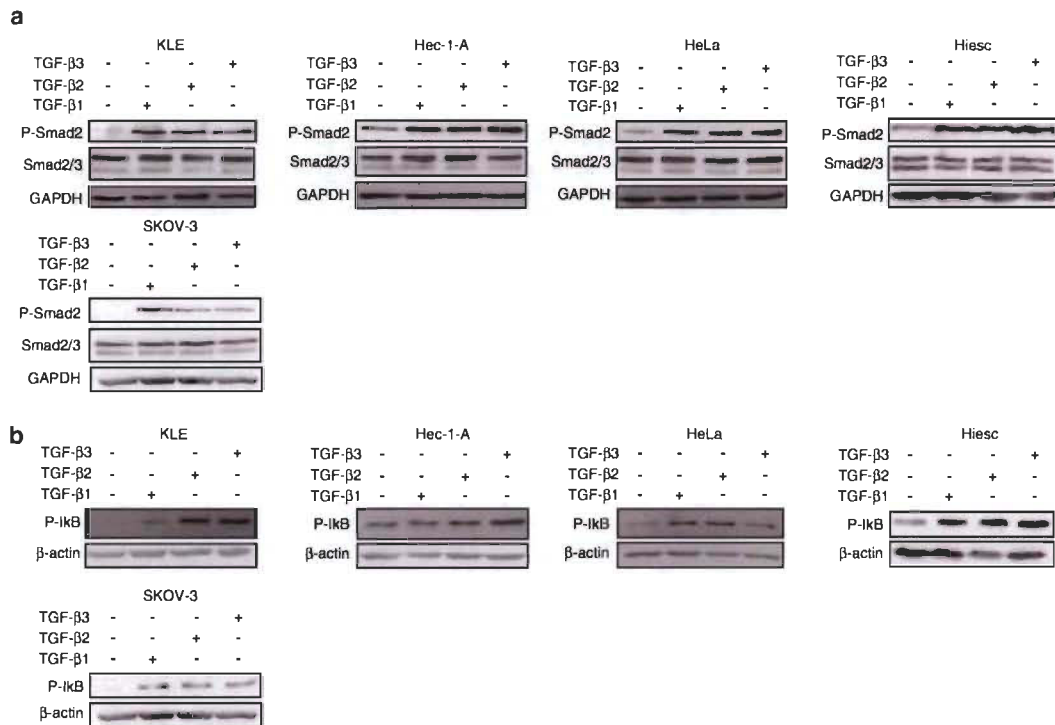


Figure 2.2

TGF- β regulates Par-4 expression by activating Smad and/or NF- κ B pathways.

(a) Cells were treated with different isoforms of TGF- β (10 ng/ml) for 24 h. Activation of Smad2 was analyzed using P-Smad2 antibody. GAPDH was used as a loading control. (b) Cells were treated with different isoforms of TGF- β (10 ng/ml) for 24 h. Activation of NF- κ B pathway was analyzed by I κ B- α phosphorylation. β -actin was used as a loading control

Because paracrine TGF- β upregulates Par-4 expression, next we sought to determine whether autocrine TGF- β signaling has the same effect on Par-4 levels. HeLa cells were transiently transfected with empty (pcDNA3.1) and TGF- β 3 (pcDNA3.1-TGF- β 3) plasmids and protein levels were analyzed by western blotting. As shown in Figure 2.3a, Par-4 was found to be significantly upregulated in TGF- β 3 transfected cells compared with empty vector transfected cells. Autocrine TGF- β signaling occurs in endometrial and cervical cancer cells¹⁷; therefore, we tested whether blockade of autocrine TGF- β signaling affects endogenous Par-4 levels. First we used SB431542 (Alk5 inhibitor) that was identified as an inhibitor of the TGF- β type I receptor (activin receptor-like kinase, Alk530 to block autocrine TGF- β signaling. Treatment with Alk5 inhibitor in HeLa cells blocked constitutive TGF- β signaling as shown by decreased levels of phosphorylated Smad2, in parallel it also decreased Par-4 protein levels (Figure 2.3b). Identical results were also observed in Hec-1-A cells (Supplementary Material Supplementary Figure S2A). Similarly, blocking TGF- β receptor signaling using neutralizing TGF- β antibody reduced endogenous Par-4 protein levels in HeLa cells (Figure 2.3c). These results demonstrate that autocrine TGF- β signaling constitutively regulates endogenous Par-4. In addition to Smads, we have previously shown that TGF- β also signals through PI3K/Akt and ERK. In light of the above results shown in Figure 2.2b that each TGF- β isoform induces I κ B- α phosphorylation and the fact that I κ B- α is a substrate of PI3K/Akt, and activation of PI3K/Akt therefore stimulates NF- κ B activity, we verified whether blocking PI3K/Akt pathway is sufficient to block Par-4 upregulation. We used PI3K inhibitor, LY294002, to inhibit PI3K/Akt signaling. The results demonstrate that treatment with LY294002 decreased Par-4 levels, suggesting that Par-4 is indeed regulated by the activation of NF- κ B signaling cascade in HeLa cells (Figure 2.3d). Using the same model, we then reduced p65 levels through siRNA to confirm this observation. The results corroborated those obtained through the inhibition of PI3K/Akt pathway by LY294002, demonstrating that the NF- κ B pathway was indeed involved in Par-4 regulation (Figure 2.3e). We used a similar approach to demonstrate the involvement of Smad signaling in Par-4 expression. We used a Smad4 siRNA to reduce its expression and found endogenous levels of Par-4 to be reduced (Figure 2.3f). In contrast, treatment with U0126 (a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2)

did not have any effect on Par-4 levels (Figure 2.3g). Taken together, these results implied that TGF- β regulates Par-4 levels through Smad and NF- κ B activation.

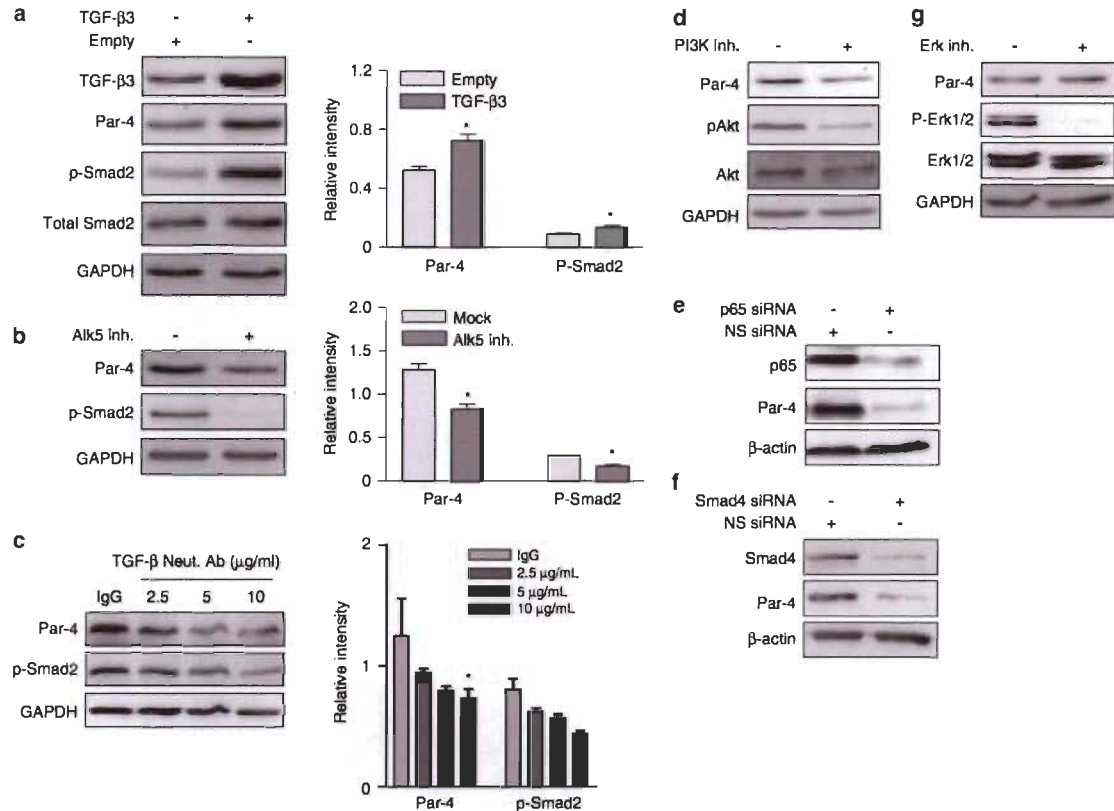


Figure 2.3

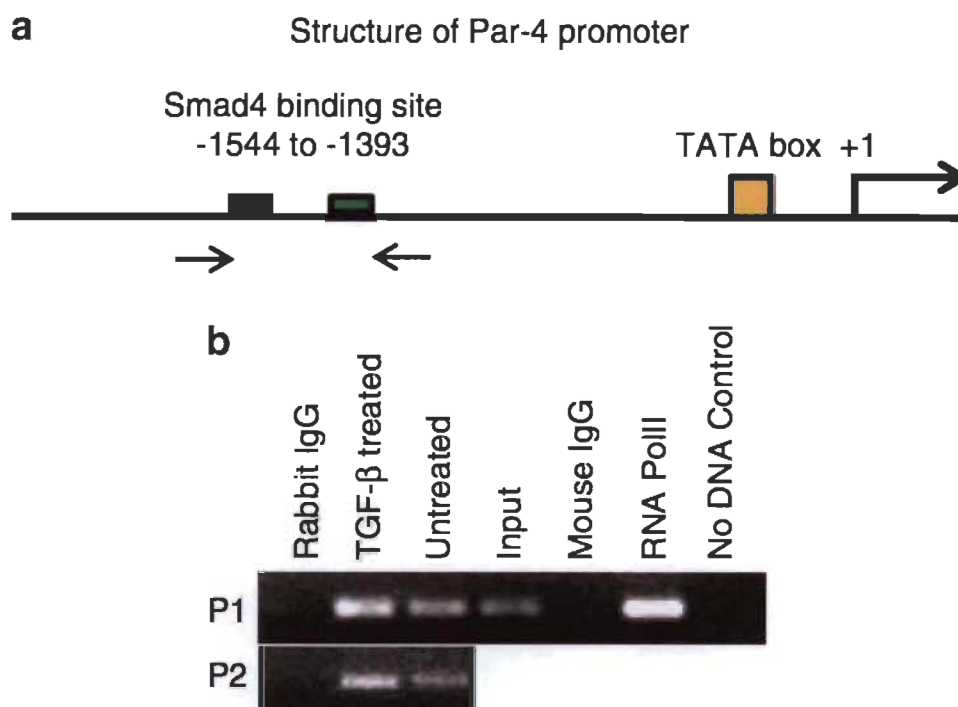
Blocking TGF- β signaling prevents Par-4 upregulation.

(a) HeLa cells were transiently transfected with 2 mg of empty or TGF- β 3 expression vector. After 48 h of transfection, proteins were analyzed by immunoblotting using antibodies against TGF- β 3, Par-4, P-Smad2, total Smad2 and GAPDH. Densitometric analyses of Par-4 and P-Smad2 protein levels are presented as mean \pm S.D. * P 0.05 compared with vehicle-treated cells. (b) HeLa cells were treated with 50 mM Alk5 inhibitor (SB431542) or vehicle for 24 h, and Par-4 protein levels were determined using western blotting. Levels of P-Smad2 were determined to monitor the efficiency of TGF- β pathway inhibition. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analyses of Par-4 and P-Smad2 protein levels are presented as mean \pm S.D. * P 0.05 compared with vehicle-treated cells. (c) HeLa cells were treated with anti-TGF- β neutralizing antibody (2.5, 5 and 10 mg/ml) or isotypic control antibody for 24 h, and Par-4 protein levels were determined using western blotting. Levels of P-Smad2 were determined to monitor the efficiency of TGF- β pathway inhibition. GAPDH were used as a loading control. Densitometric analyses of Par-4 and P-Smad2 protein levels are

presented as mean \pm S.D. *Po0.05 compared with vehicle-treated cells. (d) HeLa cells were treated with 50 mM PI3K inhibitor LY294002 or vehicle for 1 h. Par-4 protein levels were determined using western blotting. Levels of P-Akt were determined to monitor the efficiency of PI3K inhibitor. GAPDH was used as a loading control. (e) HeLa cells were transiently transfected with 50 nM of scrambled or p65-specific siRNA. After 48 h, proteins were analyzed by immunoblotting using antibodies against p65 and Par-4. b-actin was used as loading control. (f) HeLa cells were transiently transfected with 100 nM of scrambled or Smad4-specific siRNA. After 48 h, proteins were analyzed by immunoblotting using antibodies against Smad4 and Par-4. b-actin was used as loading control. (g) HeLa cells were treated with 40 mM MEK1/2 inhibitor U0126 for 1 h. Par-4 protein levels were determined using western blotting. Levels of phosphorylated ERK1/2 were determined to monitor the efficiency of MEK inhibitor. GAPDH was used as a loading control

Par-4 promoter region contains Smad-binding elements (SBE).

NF- κ B responsive elements in the Par-4 promoter region have previously been reported³¹. Therefore, NF- κ B activation mediated by I κ B- α phosphorylation in the present study could arbitrate the transcriptional upregulation of Par-4 by TGF- β . With the knowledge that Smads are also known to interact directly with SBE in the promoter regions of the target genes, we searched for the presence of SBE in the promoter of Par-4 using a chromatin immunoprecipitation (ChIP)-PCR approach. Chromatin from the TGF- β -treated and -untreated HeLa cells was immunoprecipitated using specific antibody against Smad4. Genomic DNA fragments bound to Smad4 were analyzed by PCR using random primers (P1 and P2) designed to include conserved SBE (P1: 50 -GTCT-30 at 1742 to 1739) or (P2: 50 -AGAC-30 at 1510 to 1507) in Par-4 promoter region (Figure 2.4a). Analysis of genomic DNA immunoprecipitated with Smad4 and RNAPolIII antibody efficiently recovered Par-4 promoter from both TGF- β -treated and -untreated HeLa cells (Figure 2.4b, lane 2 and 3) suggesting paracrine and autocrine TGF- β signaling occurs in these cells. Interestingly, Smad4 was found to bind at both the predicted SBE using primer P1 and P2. No genomic DNA was pulled out in immunoprecipitates from rabbit or mouse IgGs (Figure 2.4b lane 1 and 5). These results demonstrate that Smads indeed interact with the Par-4 promoter. All together, these findings strongly support the idea that Par-4 is upregulated by TGF- β through both the pathway and Smad pathway.

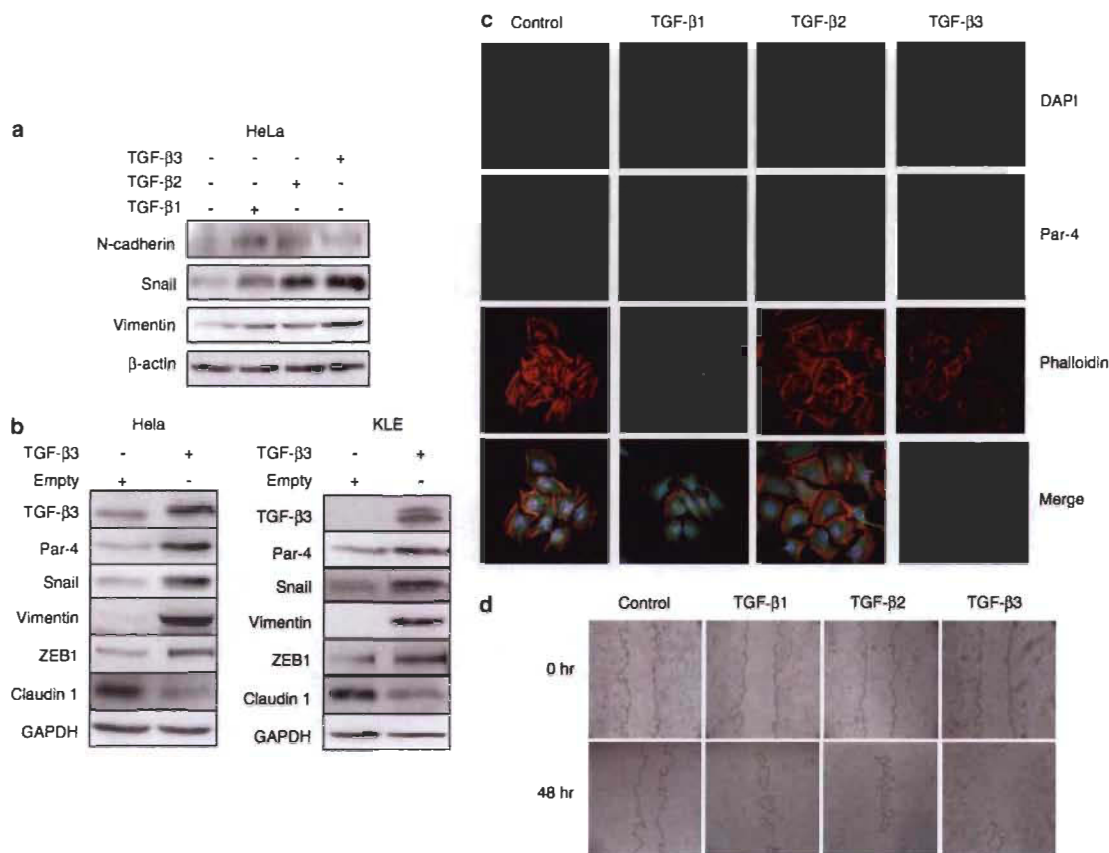


Par-4 expression is increased during TGF-β-induced EMT.

Figure 2.4 Par-4 promoter region contains Smad-binding elements (SBE).
 (a) P1 and P2 indicate the PCR primer sets used for ChIP assays. (b) HeLa cells were treated with TGF-β3 (10 ng/ml) for 24 h. Chromatin DNA was immunoprecipitated using specific antibody against Smad4. An antibody to RNA polymerase II (RNAPolII) is used as a positive control and normal rabbit IgG/mouse IgG served as a negative control. DNA fragments were amplified with primers P1 and P2 specific for Par-4 promoter. Lane 1, rabbit IgG; lane2, TGF-β3 treated cells; lane 3, untreated cells; lane 4, input (10% sonicated chromatin DNA). 'Input' indicates control PCR and shows the amount of Par-4 promoter DNA present in each sample before ChIP. Lane 5, mouse IgG; lane 6, RNAPolII, lane7, no DNA PCR control. ChIP-PCR products for Par-4 promoter were observed in anti-Smad4 ChIP (lane 2 and 3), input (lane 4) and anti-RNA polymerase II ChIP (positive control, (lane 6))

Previous studies hinted at the ability of TGF-β to induce EMT in endometrial cells³². However, a deeper analysis seemed necessary to confirm TGF-β role in the enactment of this mechanism. We treated various endome- trial cells with all three isoforms of TGF-β and examined the regulation of classical EMT markers. As shown in Figure 2.5a, HeLa

cells displayed an upregulation of the N-Cadherin, an important marker of EMT; both the Snail and vimentin levels were also increased. Similar results were observed in Hiesc, KLE and SKOV-3 cell lines. They displayed a pronounced shift in cadherins expression, one of the hallmarks of EMT as well as an upregulation of Snail. MCF7 cells did not show enhanced Snail expression or changes in their cadherin profile. However, they exhibited drastically reduced claudin-1 expression, which is an indicator of metastatic potential and poor prognosis³³⁻³⁶ (Supplementary Figure S2B). Taken together, these results suggest that TGF- β induces EMT in both uterine and ovarian cells as well as promote metastasis and tumor progression through the loss of claudin-1 in luminal breast cancer cells. These results were also confirmed by autocrine TGF- β 3 signaling by transfecting HeLa and KLE cells with TGF- β 3 plasmid. The results demonstrate that overexpression of TGF- β 3 induces expression of vimentin and transcriptional factors, Snail and ZEB1. In addition, there was a decrease in the expression of claudin-1. In parallel, Par-4 was found to be upregulated (Figure 2.5b). To support these observations, we further analyzed TGF- β 's ability to induce morphological changes characteristic of EMT. As shown in Figure 2.5c, confocal microscopy examination revealed that treatments with each TGF- β isoforms induces a drastic alteration in HeLa cell shape; whereas, untreated cells display the typical cobblestone-like epithelial characteristics phenotype, a 24-h treatment with all three TGF- β isoforms induced an elongated and spindle shaped phenotypic characteristics of fibroblasts. This effect was most evident in TGF- β 3-treated cells. Similar changes in cell morphology were observed in both KLE and SKOV-3 cells using TGF- β 3 (Supplementary Material Supplementary Figure S2C). Besides inducing the morphological characteristics of EMT, TGF- β treatment also resulted in behavioral changes that are associated with EMT, such as an increase in cell motility and invasion. We have observed that the cell migration ability of HeLa cells was increased following TGF- β stimulation with each isoforms (Figure 2.5d). Prolonged exposure of the cells to TGF- β 3 induced upregulation of various EMT markers as well as a progressive increase of Par-4 in a similar fashion (Supplementary Figures S2D and E). Together, these suggest that TGF- β induces EMT in multiple cell lines, a process in which Par-4 has a potential role.

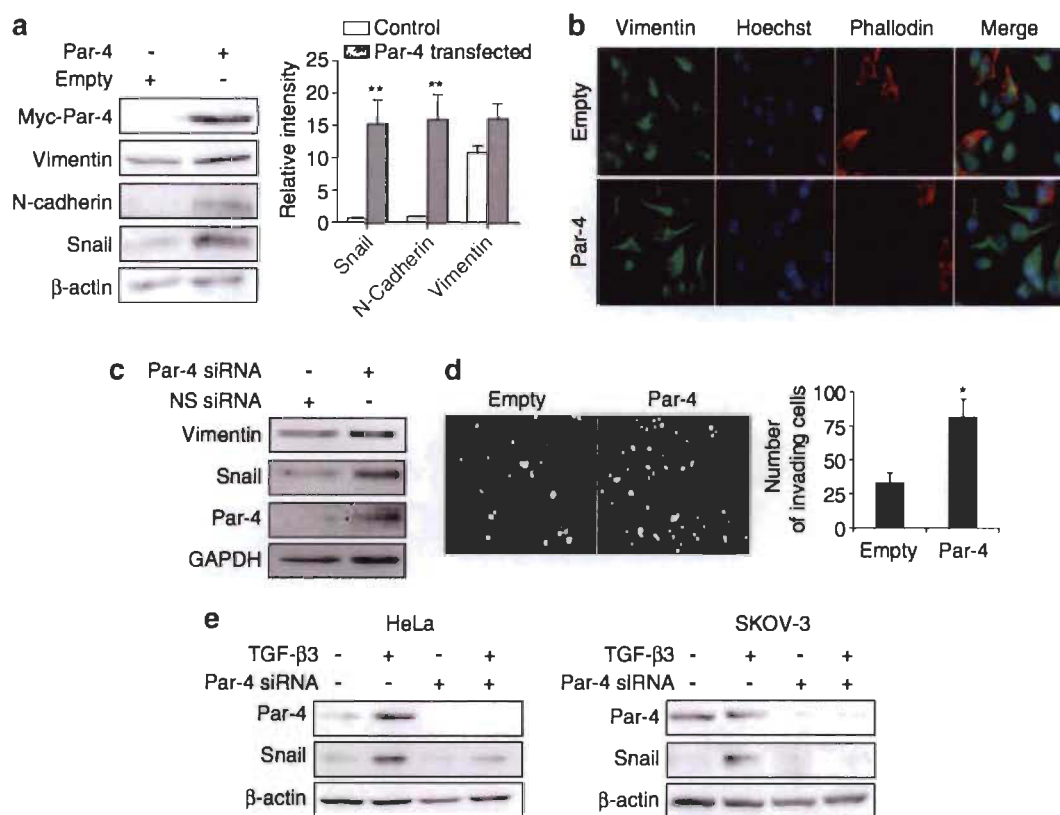
**Figure 2.5****TGF-β induces upregulation of Par-4 concomitant with EMT.**

(a) HeLa cells were treated with different isoforms of TGF-β (10 ng/ml) for 48 h. Total proteins were extracted for western blot analysis using N-Cadherin, vimentin and Snail antibody. β-actin was used as a loading control. (b) HeLa and KLE cells were transiently transfected with 2 mg of empty or TGF-β3 expression vector. After 48 h of transfection, proteins were analyzed by immunoblotting using antibodies against TGF-β3, Par-4, Snail, vimentin, ZEB1 and claudin-1. GAPDH was used as a loading control. (c) HeLa cells were treated with different isoforms of TGF-β (10 ng/ml) for 48 h. Cells were analyzed for morphological changes by confocal microscopy. Magnification used was 60 with oil emersion. (d) Equal number of HeLa cells seeded in 6-well plates. After 24 h, cell monolayer was scratched to create a wound and treated with different isoforms of TGF-β (10 ng/ml) for 24 and 48 h. Wound closure was analyzed by microscopy using 10 magnification

Par-4 directly upregulates other EMT inducers.

To address the potential relationship between Par-4 and other transcription factors and signaling molecules implicated in EMT, we tested whether Par-4 itself induces the

expression of known EMT markers. HeLa cells were transiently transfected with Myc-tagged Par-4 plasmid followed by immunoblotting. The results showed that Par-4 increased endogenous protein levels of N-cadherin, vimentin and Snail (Figure 2.6a). Similar results were found in SKOV-3 cells. Interestingly, Par-4 reduced claudin-1 protein levels, similar to the results obtained with TGF- β treatments (Supplementary Figure S3A). This suggests that Par-4 alone is sufficient to reduce claudin expression in MCF7 cells. Observations made in HeLa cells were further validated using immunofluorescence microscopy. It is evident from Figure 2.6b that Par-4 overexpression induced vimentin expression and the cells acquired elongated shape, which is a characteristic feature of EMT. In contrast, knockdown of Par-4 using siRNA downregulated vimentin and Snail protein levels (Figure 2.6c). Using transwell migration assay, we observed that Par-4 overexpression also enhances cell migration (Figure 2.6d). We then proceeded to assess the effect of Par-4 knockdown concurrent with exogenous TGF- β treatments to determine whether Par-4 was necessary for TGF- β to induce EMT characteristics. Both HeLa and SKOV-3 cells were subjected to Par-4 knockdown using siRNA as well as TGF- β 3 treatments. We observed that TGF- β 3 was unable to induce enhanced Snail expression in the absence of Par-4, further confirming its crucial role in TGF- β -mediated EMT (Figure 2.6e). Taken together, the data suggest that upregulation of Par-4 in response to TGF- β has an essential role in the inducement of EMT.

**Figure 2.6****Par-4 regulates EMT.**

(a) HeLa cells were transiently transfected with 2 mg of the empty or Par-4 in pCMV entry-Myc-DDK vector. After 48 h, total cell lysates were analyzed for vimentin, Snail and N-cadherin protein levels by western blotting. Anti-Myc tag antibody was used to reveal the extent of Par-4 overexpression. β -actin was used as a loading control. Densitometric analyses of protein levels are presented as mean \pm S.D. **Po0.01 compared with empty plasmid transfected cells. (b) HeLa cells were transiently transfected with 2 mg of the empty or Par-4 in pCMV entry-Myc-DDK vector. After 48 h, cells were subjected to immunofluorescence for vimentin (Alexa Fluor 594, green). The nuclei were stained with Hoechst 33258 (blue), and phalloidin (red), which stains the actin cytoskeleton, is used to visualize the shape and integrity of the cells. Magnification, 63. (c) HeLa cells were transfected with Par-4 siRNA or control nonsilencing (NS) siRNA. After 48 h, cells were collected for western blot analysis using Par-4, Snail and vimentin antibodies. GAPDH was used as a loading control. (d) HeLa cells were transiently transfected with 2 mg of the empty or Par-4 in pCMV entry-Myc-DDK vector. After 48 h, cells were trypsinized and placed in matrigel-coated transwell filter chambers and incubated for 24 h. The noninvading cells were removed from the upper surface of the membrane, cells that adhered to the lower surface of the filter were

fixed, and the nuclei were stained with Hoechst 33258 and analyzed by fluorescence microscopy. Magnification, 10. Histogram shows number of cells invading matrigel from three independent experiments. Nuclei were counted from five different fields in each experiment. *Po0.05. (e) HeLa and SKOV-3 cells were transfected with Par-4 siRNA or control nonsilencing (NS) siRNA as well as TGF- β 3. After 48 h, cells were collected for western blot analysis using Par-4 and Snail antibodies. b-actin was used as a loading control

XIAP regulates Par-4 cleavage in normal and malignant cells.

We have previously established that TGF- β upregulates XIAP and recently we have also evidenced that cleavage of Par-4 by caspase-3 is required to potentiate its proapoptotic activity³⁷. Present study also evidenced that TGF- β was a crucial regulator of Par-4 levels. We thus sought to understand the relationship between Par-4 and XIAP. We first used primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from genetically engineered XIAP knockout (XIAP $-/-$) mice or from control (XIAP $+/+$) mice to investigate whether XIAP regulates Par-4 protein in vivo. High levels of Par-4 were found in XIAP $+/+$ cells compared with XIAP $-/-$ cells (Figure 2.7a) suggesting that XIAP constitutively regulates Par-4 levels in resting cells. Further, we endeavored to understand the process by which XIAP regulates Par-4 levels. We thus investigated whether XIAP regulates Par-4 through the control of its cleavage. Wild type (WT) and XIAP knockout MEF cells were treated with cisplatin to induce apoptosis and thus Par-4 cleavage. We found that XIAP $+/+$ cells failed to cleave Par-4 when treated with cisplatin; however, the knockout of XIAP restored the ability of MEF cells to cleave Par-4. We also observed an increased level of cleaved caspase-3 as well as a lowered level of full length Par-4 (Figure 2.7b). To further understand the mechanism by which XIAP controls Par-4 cleavage, we used HeLa cells transfected with XIAP constructs (Myc6-XIAP (WT), Myc6-XIAP-H467A (inactive mutant), or empty vector. These transfections were followed by cisplatin treatment to induce apoptosis. Using this approach, we found that caspase-3-mediated Par-4 cleavage was completely abrogated in WT XIAP overexpressing cells and not in mutant XIAP expressing cells, suggesting that XIAP RING domain is necessary for the control of Par-4 cleavage (Figure 2.7c). The obtained results validated XIAP as a key regulator of Par-4 protein levels, in both normal and malignant cells, through the control of its cleavage.

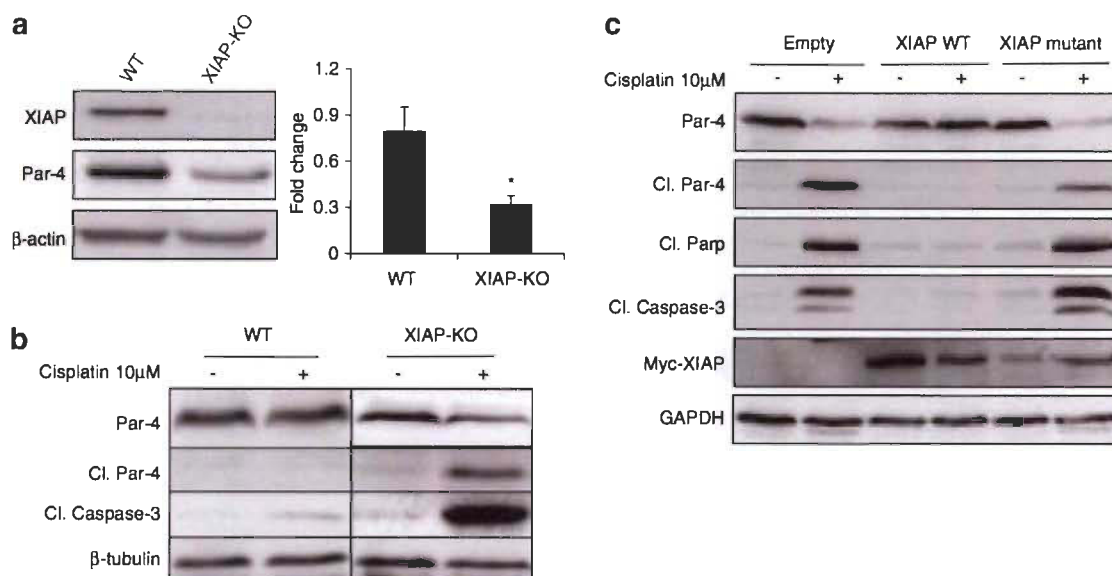


Figure 2.7

XIAP regulates Par-4 protein levels through the control of its cleavage.

(a) Total proteins were collected from primary MEFs derived from XIAP $+/+$ and XIAP $-/-$ mice and Par-4 protein levels were determined using western blotting. Densitometric analysis of Par-4 protein levels is presented as mean \pm S.D. *, $P < 0.05$. β -actin was used as a loading control.

(b) HeLa cells were transiently transfected with 1 mg of control plasmid (pcDNA3; empty), mutant Myc6-XIAP-H467A plasmid (XIAP mutant) or Myc6-XIAP WT plasmid (XIAP WT) using Fugene 6. After 48 h, cells were incubated in the presence or absence of 10 mM cisplatin. Following cisplatin treatment for 24 h, cells were collected for western blotting. Membranes were probed using antibodies against Par-4, Myc tag (for XIAP). Cleaved PARP and cleaved caspase-3 antibodies were used to monitor caspase-3 activation. GAPDH was used as a loading control.

(c) Primary MEFs derived from XIAP $+/+$ and XIAP $-/-$ mice were treated with 10 mM cisplatin for 24 h. Cells were collected and western blotting was performed using antibodies against Par-4 and cleaved caspase-3. β -tubulin was used as a loading control.

Par-4 cleavage inhibits its ability to induce increased cell motility and EMT-like characteristics.

TGF- β induces apoptosis in a variety of cell types; in contrast, we have previously reported that TGF- β is unable to trigger apoptosis in endometrial cancer cells under similar conditions²⁷. Given that TGF- β upregulates Par-4, which is a known pro-apoptotic protein, it was surprising that the cells did not undergo apoptosis. Previous experiments demonstrated that XIAP regulated Par-4 levels through the regulation of its caspase-3-mediated cleavage. We sought to understand whether this mechanism could explain the change in Par-4 effect from tumor suppressor to EMT inducer. We hypothesized that the inhibition of Par-4 cleavage would limit its ability to induce apoptosis and increase its EMT inducing capabilities. We transfected both HeLa (Figure 2.8a) and Hiesc (Figure 2.8b) cells with XIAP siRNA, followed by a transfection of either full length Par-4 or empty vector. The Par-4 transfected cells demonstrated highly enhanced motility and acquired morphological characteristics typical of cells undergoing EMT such as elongation, spindle-like appendages and general fibroblastic morphology. This correlated with previous observations. However, cells transfected with both Par-4 expression plasmid and XIAP siRNA did not display EMT-like morphology (Figure 2.8c) and did not acquire heightened motility. Altogether, these results support the idea that Par-4 is a pivotal effector of EMT whose effect is regulated by its cleavage, a mechanism on which XIAP exerts a control through caspases inhibition.

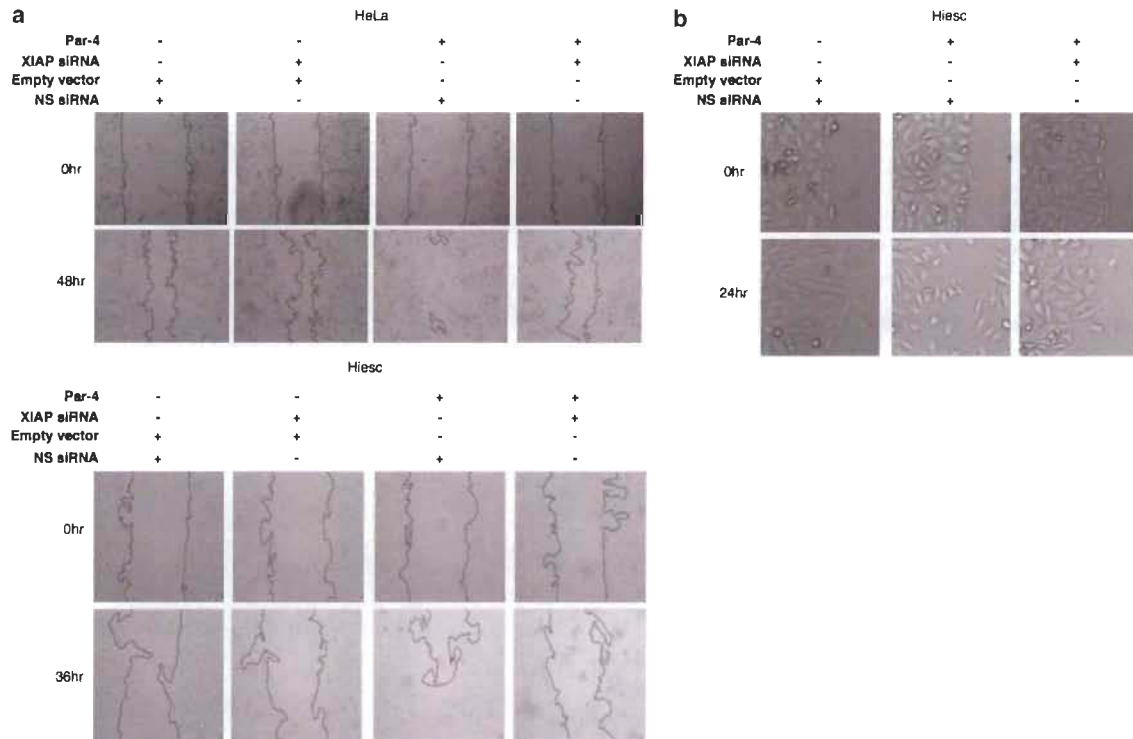


Figure 2.8 **Par-4 cleavage inhibits its ability to induce motility and morphological changes.**

(a) Equal number of HeLa and Hiesc cells were seeded in 6-well plates and allowed to grow for 24 h. Cells were then transfected with XIAP siRNA for a period of 6 h at the end of which they were transfected with a Par-4 expression plasmid. Cells were then allowed to grow for an additional 18 h; the media was then changed and the cell monolayer was wounded with a plastic tip. This was considered as time 0. Cells were then observed every 12 h. Wound closure was analyzed by microscopy using 10 magnification (b) HeLa cells morphology before and after transfections at 10 magnification

Discussion

The TGF- β signaling pathway governs multiple biological processes through the regulation of various target genes. However, alterations or genetic mutations in TGF- β signaling often lose its growth inhibitory properties and thus making room for cancer cells to proliferate, invade and metastasize during tumor progression. EMT is an important event in tumor progression, which leads to cell invasion and metastasis. By activating both Smad-dependent and Smad-independent pathways, TGF- β acts as a potent inducer of EMT^{4,5}. Despite the greater understanding and identification of TGF- β responsive genes,

knowledge gap remains as to what controls the switching of roles from tumor suppressor to a tumor promoter. In the present study we have identified Par-4 as a target of TGF- β signaling and demonstrated its role during TGF- β -induced EMT (Supplementary Figure S4).

Previous studies have demonstrated an induction of Par-4 expression in response to diverse apoptotic stimuli. Although endogenous Par-4 itself does not induce apoptosis, yet it is important for apoptosis induced by exogenous cytotoxic insults. Currently, what regulates Par-4 expression is still under investigation. The present study provides the first evidence that TGF- β can induce Par-4 at both transcript and translational level. Both Smad and NF- κ B signaling pathways were found to be involved in TGF- β -mediated Par-4 upregulation. Previously, NF- κ B responsive elements have been evidenced in the Par-4 promoter region, which leads to the NF- κ B-dependent transactivation of Par-4³¹. Herein, we confirm that Par-4 expression is regulated by NF- κ B, but most importantly, using a ChIP-PCR approach, we uncovered Smad4-binding elements in Par-4 promoter region.

Identification of the target genes of Smad4 has been reported in both normal epithelial and cancer cells³⁸. Originally, Zawel et al.³⁹ identified an 8-bp palindromic sequence 5'-GTCTAGAC-3' as the SBE particularly in case of Smad3 and Smad4 and later it was shown that 5'-GTCT-3' or its complement 5'-AGAC-3' alone can also act as SBE. Interestingly, CAGA is also recognized to mediate binding to Smad3 and Smad4, and are required for TGF- β -induced transcriptional activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter⁴⁰. Later studies have suggested that in addition to the GTCT and AGAC elements, Smad4 is also able to recognize a GC-rich sequence^{41,42}. It is important to note that Par-4 promoter sequence is extremely GC-rich. A careful examination of the Par-4 promoter region revealed many potentially important SBE or SBE-like sequence motifs. We have identified that Par-4 contains two SBE located at 1742 to 1739 (5'-GTCT-3') and 1510 to 1507 (5'-AGAC-3'). One of these sites (1742 to 1739) contains a perfect Smad box (GTCT). Interestingly, the other consensus sequence: 1510 to 1507 (5'-AGAC-3') is similar to the SBE found in the promoter region of TGF- β target genes, such as α 2(I) collagen, and germline Ig α constant region⁴³. In

addition to the two SBE we have identified here, Par-4 promoter contains many regions that can mediate TGF- β responses through Smad binding. Previously it has been suggested that one or more SBE could be present in many Smad-responsive promoter regions⁴³.

Surprisingly, while Par-4 was being upregulated by TGF- β , cells were not undergoing apoptosis²⁷. In a previous study, we have reported that XIAP is also a transcriptional target of TGF- β signaling¹⁷. As caspase-3-mediated cleavage of Par-4 potentiates its apoptotic activity, we found that XIAP prevents cleavage of Par-4 by caspase-3 thus promoting the accumulation of the uncleaved form of the protein. Furthermore, a low level of Par-4 in XIAP KO MEFs implies that XIAP also regulates endogenous levels of Par-4. Solid evidence is available in literature regarding Par-4 as a negative regulator of XIAP through inhibition of ζ PKC–NF- κ B pathway⁴⁴. All together this implies that a negative feedback loop exists between the regulation of Par-4 and XIAP.

Tumor suppressor role of Par-4 is well established based on the fact that Par-4 is downregulated in various types of tumors. Our data demonstrating a novel role of Par-4 during EMT suggest that Par-4 could also function as a tumor promoter thus contradicting its reported tumor suppressor activity. However, it is possible that similar to TGF- β , Par-4 has a dual role during tumorigenesis. The possible mechanism by which Par-4 mediates TGF- β -induced EMT likely involves an association with WT1 and/or aPKC. Par-4 has previously been shown to physically interact with WT1 and aPKC in the nucleus. In the present study, Par-4 was found to accumulate in the nuclear extracts following TGF- β treatment (Supplementary Figures S3B and C) suggesting that, on TGF- β stimulation, Par-4 readily translocates to the nucleus. Interestingly, WT1 was shown to regulate EMT by upregulating Snail and downregulating E-cadherin by binding to their promoters⁴⁵. Thus our results herein demonstrating that Par-4 accumulates in the nucleus and upregulates Snail led us to speculate that Par-4, which is a binding partner for WT1, may act as a transcriptional activator of WT1 and thus could promote EMT. The absence of enhanced Snail expression following TGF- β treatments or Par-4 transfection in MCF7 cells could explain the lack of changes in these cells cadherin expression profile. Multiple

articles report MCF7 as Snail-negative cells^{46,47}; the exogenous expression of this gene generally induced EMT characteristics in MCF7. However, our study demonstrates that Par-4 upregulation could be directly responsible for TGF- β -mediated claudin-1 downregulation; this loss of expression is of critical importance in the establishment of metastatic tumorigenesis, as widely reported by the literature^{33,35,36}. It is also the hallmark of the claudin-low breast cancer subtype⁴⁸. Because of the presence of leucine zipper domain at the C terminus, it will be interesting to determine if Par-4 can itself act as a transcription factor to exert a specific function during EMT. Concerning the involvement of aPKC, recently Gunaratne et al. have specifically shown that inhibition of aPKC isoforms delays TGF- β receptor degradation and extends TGF- β -induced Smad2 signaling. Given that Par-4 inhibits aPKC, it is possible that upregulation of Par-4 following TGF- β stimulation could inhibit aPKC in the cells, which further leads to prolonged TGF- β signaling for EMT induction. Collectively, these findings highlight a broad role for Par-4 in TGF- β -induced EMT. Further studies are warranted to dissect the unraveled roles of Par-4 in tumor progression. This study establishes for the first time that Par-4 regulates EMT, the first process attributed to Par-4 that is uninvolved with apoptosis. NF- κ B

Acknowledgements.

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-66987).

References

1. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442–454.
2. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6686–6691.
3. ThieryJP,SleemanJP.Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 131–142.

4. Zavadil J, Bottinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764–5774.
5. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007; 178: 437–451.
6. Penafuerte C, Galipeau J. TGF β secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1197–1206.
7. Maitra M, Cano CA, Garcia CK. Mutant surfactant A2 proteins associated with familial pulmonary fibrosis and lung cancer induce TGF- β 1 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 21064–21069.
8. Curran CS, Keely PJ. Breast tumor and stromal cell responses to TGF- β and hypoxia in matrix deposition. *Matrix Biol* 2012; 32: 95–105.
9. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF- β : regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 1992; 41: 557–559.
10. Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, Baarsma HA, Borger P, Roth M et al. Noncanonical WNT-5 A signaling regulates TGF- β -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB J* 2012; 27: 1631–1643.
11. Goc A, Choudhary M, Byzova TV, Somanath PR. TGF β - and bleomycin-induced extracellular matrix synthesis is mediated through Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Cell Physiol* 2011; 226: 3004–3013.
12. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807–821.
13. Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR et al. TGF- β switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2003; 112: 1116–1124.
14. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117–129.
15. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277–279.

16. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 415–428.
17. Van Themsche C, Chaudhry P, Leblanc V, Parent S, Asselin E. XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF- β signaling. *Mol Cancer* 2010; 9: 216.
18. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685–700.
19. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 2003; 425: 577–584.
20. Singh M, Chaudhry P, Parent S, Asselin E. Ubiquitin-proteasomal degradation of COX-2 in TGF- β stimulated human endometrial cells is mediated through endoplasmic reticulum mannosidase I. *Endocrinology* 2012; 153: 426–437.
21. El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5516–5525.
22. Zapata-Benavides P, Mendez-Vazquez JL, Gonzalez-Rocha TR, Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Garza-Garza R et al. Expression of prostate apoptosis response (Par-4) is associated with progesterone receptor in breast cancer. *Arch Med Res* 2009; 40: 595–599.
23. Moreno-Bueno G, Fernandez-Marcos PJ, Collado M, Tendero MJ, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia-Cao I et al. Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 1927–1934.
24. Cook J, Krishnan S, Ananth S, Sells SF, Shi Y, Walther M et al. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 1205–1208.
25. Nalca A, Qiu SG, El-Guendy N, Krishnan S, Rangnekar VM. Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J Biol Chem* 1999; 274: 29976–29983.
26. Zhao Y, Rangnekar VM. Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 1867–1874.
27. Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Transforming growth factor- β 3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of

- apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2007; 282: 4794–4802
28. Zeinoun Z, Teugels E, De Bleser PJ, Neyns B, Geerts A, De Greve J. Insufficient TGF- β 1 production inactivates the autocrine growth suppressive circuit in human ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res* 1999; 19: 413–420.
 29. Yang L, Yang J, Venkateswarlu S, Ko T, Brattain MG. Autocrine TGF β signaling mediates vitamin D3 analog-induced growth inhibition in breast cells. *J Cell Physiol* 2001; 188: 383–393.
 30. InmanGJ,NicolasFJ,CallahanJF,HarlingJD,GasterLM,ReithADetal.SB-431542isa potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 65–74.
 31. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Okayasu I. Transcriptional regulation of pro- apoptotic Par-4 by NF-kappaB/p65 and its function in controlling cell kinetics during early events in endometrial tumorigenesis. *J Pathol* 2010; 221: 26–36.
 32. Lei X, Wang L, Yang J, Sun LZ. TGF β signaling supports survival and metastasis of endometrial cancer cells. *Cancer Manag Res* 2009; 2009: 15–24.
 33. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 55–63.
 34. Myal Y, Leygue E, Blanchard AA. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel ‘claudin high’ subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 956897
 35. Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug deliv Rev* 2005; 57: 919–928.
 36. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R296–R305.
 37. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E. Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 826–839.
 38. Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Imamura T, Aburatani H, Miyazono K. Promoter- wide analysis of Smad4 binding sites in human epithelial cells. *Cancer Sci* 2009; 100: 2133–2142.

39. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1998; 1: 611–617.
40. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998; 17: 3091–3100.
41. Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A. *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 1997; 388: 304–308.
42. Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 1998; 2: 109–120.
43. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783–2810.
44. Garcia-Cao I, Lafuente MJ, Criado LM, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. Genetic inactivation of Par4 results in hyperactivation of NF-kappaB and impairment of JNK and p38. *EMBO Rep* 2003; 4: 307–312.
45. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* 2010; 42: 89–93.
46. Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA. The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer. *PLoS ONE* 2011; 6: e26514.
47. Dhasarathy A, Kajita M, Wade PA. The transcription factor snail mediates epithelial to mesenchymal transitions by repression of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2907–2918.
48. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R68.
49. Chapdelaine P, Kang J, Boucher-Kovalik S, Caron N, Tremblay JP, Fortier MA. Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 309–319.

CHAPITRE III

REGULATION OF THE PI3K/AKT PATHWAY DURING DECIDUALIZATION OF ENDOMETRIAL STROMAL CELLS

François Fabi, Kathy Grenier, Sophie Parent, Pascal Adam, Laurence Tardif, Valérie Leblanc, Eric Asselin

Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells.

PLoS One. 2017 May 5;12(5):e0177387. doi: 10.1371/journal.pone.0177387.

eCollection 2017

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue PLoS One le 5 mai 2017. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs.

3.1 Contribution des auteurs

François Fabi et Kathy Grenier, étudiante à la maîtrise, ont effectué de façon équivalente les expérimentations présentées dans l'article. François Fabi a effectué la majorité de la rédaction du manuscrit et a été supporté par Kathy Grenier. Sophie Parent, assistante de recherche, a procédé principalement aux expériences de PCR quantitatives et aidé à la mise au point des protocoles. Valérie Leblanc, assistante de recherche, a été instrumentale dans le raffinement du protocole de décidualisation. Pascal Adam, étudiant au doctorat, a procédé à certaines expériences concernant la quantification de l'expression des isoformes d'Akt. Laurence Tardif, étudiante à la maîtrise, a procédé à certaines expériences de Western Blot. Eric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et a supervisé l'élaboration et la conception expérimentale de ce manuscrit.

3.2 Résumé de l'article (français)

Au Canada, l'infertilité est constamment en croissance alors que 16% des couples canadiens éprouvent des difficultés à concevoir. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'infertilité mais la dysfonction communicationnelle entre l'embryon et l'endomètre

maternel semble l'un des causes les plus plausibles expliquant cette problématique. Afin que la fenêtre d'implantation soit ouverte au moment opportun, il est nécessaire pour les cellules stromales de l'endomètre de proliférer et se différencier, un évènement nommé décidualisation; toutefois, les mécanismes fondamentaux permettant cette transformation restent encore aujourd'hui mal élucidés. En effet, les dynamiques expliquant la régulation serrée entre l'apoptose et la prolifération cellulaire lors de l'implantation embryonnaire sont complexes et insuffisamment comprises. Akt est une kinase, présentant trois isoformes distincts, impliquée principalement dans le contrôle de la survie cellulaire; cette dernière est toutefois aussi charnière dans la réponse cellulaire au glucose et la synthèse de glycogène. Nonobstant une certaine redondance fonctionnelle, peu d'information apparaît disponible quant aux rôles spécifiques de chacun de ces isoformes dans les processus de décidualisation.

L'objectif de cette étude est d'examiner la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt lors des processus de décidualisation des cellules stromales de l'endomètre. Afin d'accomplir cet objectif, l'expression des isoformes d'Akt ainsi que l'activité d'Akt, via la quantification de sa phosphorylation, ont été mesurés. La phosphorylation de I κ B, ainsi que celle de d'autres substrats d'Akt, a aussi été quantifiée afin d'évaluer l'activité de la voie de signalisation. Nos résultats montrent que la décidualisation semble accompagnée d'une diminution des niveaux protéiques de divers isoformes Akt ainsi que d'une réduction de sa phosphorylation; surprenamment, nous avons observé, de façon concomitante, une augmentation de la phosphorylation de I κ B et la translocalisation simultanée de la sous-unité p65 de NF- κ B au noyau; au contraire, Par-4, une protéine régulatrice de la différenciation cellulaire, apparaît comme exclue du noyau. Nos résultats suggèrent aussi que la décidualisation réduit la capacité de migration des cellules HIESC et que la voie de signalisation PI3K/Akt pourrait être responsable de cet effet. Finalement, des analyses d'expression génique suggèrent que seul Akt1 et Akt2 s'opposent à l'induction de la décidualisation, soulignant la spécificité fonctionnelle possible des isoformes dans un contexte physiologique.

En somme, nos résultats suggèrent qu'Akt, de façon isoforme-spécifique, exerce des effets spécifiques sur l'induction de la décidualisation. Une meilleure compréhension de ce phénomène pourrait lever le voile sur les mécanismes régissant l'infertilité et permettre d'éventuellement améliorer la qualité des traitements octroyés aux femmes touchées par l'infertilité.

3.3 Article complet (anglais) : Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells.

Abstract

Infertility is constantly increasing in Canada, where 16% of Canadian couples are experiencing difficulty conceiving. It is thought that infertility can emanate from the dysregulated communication between the embryo and the maternal endometrium. In order to allow for this window of implantation to be open at the right moment, endometrial stromal cells proliferate and differentiate by a mechanism called decidualization. Intracellular and molecular mechanisms involved in the regulation of apoptosis and cell proliferation during decidualization of the endometrium are yet to be fully understood. It has been well demonstrated previously that Akt is importantly involved in cell survival and glycogen synthesis. Akt1, Akt2 and Akt3 isoforms have distinct physiological roles; this could also be the case during decidualization and pregnancy. The aim of this study is to investigate the regulation of PI3K/Akt pathway during the decidualization process of endometrial stromal cells. Expression of Akt isoforms, Akt activity (phospho-Akt), pI κ B and substrates of Akt during decidualization were measured. To our knowledge, these results are the first to suggest a decrease in levels of Akt isoforms as well as a downregulation of Akt activity in the process of decidualization of human endometrial stromal cells. We also uncovered that decidualization induced nuclear localization of p65 through the phosphorylation of I κ B, its inhibitory subunit; however, Par-4, a recently uncovered regulator of cell differentiation, was displaced from the nucleus upon decidualization. Our results also suggest that HIESC cells exhibit decreased motility during decidualization and that PI3K pathway inhibition could be involved in this process. Finally, we demonstrate that specific Akt isoforms present unique effects on the successful induction of decidualization. Further analyses will involve investigations to understand the precise signaling mechanisms by which this pathway is regulated.

Introduction

Infertility is a problem that increasingly afflicts Canadian; in 2012, 16% of Canadian couples were found to have difficulties conceiving, a number that has doubled in the last 30 years[1]. The main cause of infertility can be traced to communication failure between the embryo and the maternal endometrium. This complex tissue constitutes the inner lining of the uterus and undergoes cyclic, subtle and intricate changes. During the late secretory phase of the menstrual cycle, endometrial stromal cells proliferate and differentiate by undergoing decidualization, a fundamental mechanism responsible for major changes in those cell phenotypes; morphological transformations occur to the fibroblast-like endometrial stromal cells that differentiate into polygonal, epithelial-like cells, becoming enlarged with lipids and glycogen secretions [2, 3]. This process of cellular differentiation is characteristic of mesenchymal to epithelial transition (MET) [4] and is confirmable by the decreased expression of mesenchymal markers such as Slug, Snail or Vimentin[5]. Various studies have shown that decidualization-induced change in phenotype exhibits many molecular characteristics of MET; while still insufficient, many evidences point to that process as a pivotal event in the stromal cell preparedness for embryo implantation[6–8]. Decidualization is a transitory phase of the endometrium that allows the decidua to feed and protect an early implanted embryo while waiting for a complete and functional placenta. It also allows the endometrium to become receptive to embryonic signaling that precedes and favorize implantation [9].

During each reproductive cycle, the decidualization process prepares the endometrium for the incoming embryo and, possibly, implantation. Further details can be found about decidualization and implantation processes in the following review [10]. Decidualization of stromal cells is induced through the concerted effect of cAMP and progesterone, or their respective analogs, 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate (8-br-cAMP) and medroxyprogesterone acetate (MPA) [2, 11, 12]. Progesterone is necessary to induce as well as maintain the morphological and biochemical characteristics of the decidualization in a long term endometrial cell culture [11]; on the other hand, many studies have shown that cAMP main effect is to sensitize the cells to the action of the progesterone [13]. The combination of those two analogs induces faster morphological

and biochemical changes than progesterone alone. All those changes are associated with an increased secretion of many proteins, some of which are only secreted in response to the differentiation of the endometrium; they are thus known as marker of decidualization [14, 15]. Two well-known successful decidualization markers are prolactin (PRL) and insulin growth factor binding protein-1 (IGFBP1), the secretion of the former being maximal when the cells are treated with the combination of 8-br-cAMP and MPA.

It has been previously demonstrated that Akt is involved in the cell survival of the rat endometrium [16, 17]. Akt, also known as protein kinase B (PKB), is a cytosolic serine/threonine kinase that promotes cellular survival and acts as a regulator of numerous cellular functions such as cell proliferation, growth, metabolism, angiogenesis and malignant transformation [18, 19]. Up to date, three isoforms of Akt have been identified and possibly have distinct roles during the different phases of pregnancy [20]. The three isoforms of Akt, Akt1/PKB α , Akt2/PKB β and Akt3/PKB γ play different roles as shown by diverse experimentation with deficient mice involving each isoform. Each isoform is produced by distinct gene but exhibit an overall amino acids homology of 80%. [18]. All three phenotypes of knockout Akt1-2 or 3 mice are viable but the deletion of each Akt isoforms induces distinct metabolic and physiological changes. Mice devoid of Akt1 exhibit decreased cell survival observable by growth retardation and decreased in overall organ size and increased perinatal mortality [21, 22]; disruption of Akt2 causes reduction in insulin-stimulated glucose uptake in muscle and fat, so those mice are insulin intolerant and show diabetes-like symptoms [23]; on the other hand Akt3-deficient mice don't display these symptoms but present smaller brain size with a reduced total number of cell as well as decreased average cell size [24]. Although they possess differential as well as redundant effects, all three Akt isoforms are activated by a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in response to growth factors [25]. PI3-K is a heterodimers composed of two subunits, the catalytic subunit (p110) and an adaptor/regulatory subunit (p85). This kinase converts the phosphatidylinositol-3,4-diphosphate (PIP2) in phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), which interacts with the pleckstrin homology (PH) domain of the 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). This serine/threonine kinase is able to phosphorylate a threonine residue on Akt, who also binds to the PIP3 by its PH domain.

Recruitment of Akt to the plasma membrane allows its full activation through phosphorylation of two crucial sites. A threonine residue (T308 on Akt1, T309 on Akt2 and T305 on Akt3) is phosphorylated in the catalytic domain by PDK1, and a serine residue (S473 on Akt1, S474 on Akt2 and S472 on Akt3) is phosphorylated in the C-terminus domain by the complex mTORC2 [26]. Upon full activation, Akt acts as a potent inducer of cell survival and proliferation which are both crucial to the fine regulation necessary for successful implantation.

The intracellular and molecular mechanisms implicated in the regulation of apoptosis and cell proliferation during decidualization of the endometrium are yet to be fully elucidated. Akt is known to regulate the cell survival but the contribution of each distinct isoform is unclear. Considering the current knowledge of these mechanisms, the purpose of this study is to determine the role of each isoform in the decidualization of the endometrium. Our results suggest that during decidualization, the protein level of each Akt isoform decreases while we also observed a decrease of phosphorylation and thus activation which culminated in the decrease of Slug, an EMT marker, and a decrease of the phosphorylation of mTOR, a known substrate of Akt. We also uncovered that decidualization induced the activation of the NF- κ B pathway and allowed nuclear exclusion of Par-4, a known mediator of EMT. Using plasmids expressing constitutively active Akt during the decidualization process, we also established that Akt 1, 2 and 3 all delayed the production of decidualization markers PRL and IGFBP1. These results suggest that decidualization inhibits PI3K/Akt signaling pathway and activates the NF- κ B pathway; these changes might induce partial, MET-like molecular changes. Expression of Akt may interfere in the decidualization process and could be a novel therapeutic target in the treatment of infertility.

Material and methods

Cell culture

Human immortalized endometrial stromal cells (HIESC) were a kind gift from Michel A. Fortier (Centre de Recherche du Centre Hospitalier Université Laval (CHUL), Qc, Canada). Cells were cultured in RPMI medium (Thermo Scientific, Rockford, IL) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 50µg/ml of gentamycin. Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cells were maintained between 20% and 90% confluency at all times, including upon seeding.

Reagents and antibodies

Proteasomal inhibitor (Mg132), Medroxyprogesterone 17-acetate (MPA), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor (Wortmannin) and mammalian target of Rapamycin (mTOR) inhibitor (Rapamycin) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) and gentamycin sulfate were purchased from HyClone (South Logan, Utah). 8-Bromo-cAMP was obtained from Enzo Life Sciences Inc (Farmingdale, NY). Akt 1 (2938), Akt 2 (2964), AKT total (9272), phospho-AKT (4060), phospho-IκBα (2859), IκBα (9242), phospho-mTOR (2974), mTOR (2983), Par-4 (2328), PARP (9532), FoxO1 (2880), Slug (9585) and Ubiquitin (3933) primary antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Anti-Akt 3 (07-383) was obtained from Millipore (Billerica, MA), beta-tubulin antibody and HRP-conjugated GAPDH(ab9484) antibodies were from Abcam (Cambridge, MA) and monoclonal anti-β-actin-peroxidase from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were provided by Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada). A full description of antibodies, catalog numbers and concentration can be found in S1 Table.

In vitro decidualization induction of HIESC

HIESC cells were cultured in maintenance medium and then plated 5x10⁵ cells per wells. Confluent monolayers were treated in phenol red-free RPMI 1640 (Gibco® by Life

Technologies™) containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS) and 50µg/ml of gentamycin with or without 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA to induce decidualization. The culture medium was changed every two days and cells were grown at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂, supernatants were collected and cells were harvested at days 1, 3, 6 and 9.

Prolactin assays

To confirm decidualization, prolactin levels in supernatant were measured at days 1, 3, 6 and 9 of decidualization. PRL assay measurements were conducted by EIA Kit (Cayman, Ann Arbor, MI) and the optical density was read withw Fluostar OPTIMA BMG spectrophotometer (BMG Labtech Inc.; Durham, NC) at 450 nm.

Proteasomal inhibition

Proteasomal inhibition is used to determine if protein degradation occurs via ubiquitin-proteasome pathway. HIESC cells were seeded in six-wells plate and decidualization was induced in phenol red-free RPMI containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS) and 50µg/ml of gentamycin with 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA. After 48 h, Mg132 was added in fresh decidualization medium and cells were incubated for another 24 h and then harvested.

Protein extraction and western blot analysis

After each treatment HIESC cells were lysed in RIPA buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS) containing protease and phosphatase inhibitors (Complete™ and PhosSTOP from Roche Applied Science) and frozen-thawed three times, then centrifuged (13000 x g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and store at -20°C pending analysis. Equal amounts of protein extract (15 µg), as determined by Bio-Rad DC protein assay were loaded in each well and then resolved by SDS-PAGE. After that, proteins were transferred using a semi-dry cell onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA).

Membranes were blocked with 5% milk in PBS containing 0.05% Tween 20 for 1h at room temperature, probed overnight at 4°C with primary antibody, washed three times in PBS-0.05% Tween 20 and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad, Hercules, CA) for 45 minutes at room temperature. Hybridized membranes were washed three times in PBS-0.05% Tween 20 and protein detection was performed by detecting peroxidase activity using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL), as described by the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the BioImaging System (UVP, CA, USA). Nuclear/cytoplasmic fraction experiments followed identical protocols; however, lysis was instead performed using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic extraction kit (Thermo Scientific, Rockford, IL).

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR and qRT-PCR)

To measure the transcripts levels, total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini Kit from QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). Total RNA (1µg) was subjected to reverse transcription using qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) as described by the manufacturer's instructions. The reverse-transcribed RNA was then amplified by PCR using specific primers. The expression of Akt isoforms (Akt 1, 2 and 3), prolactin and IGFBP1 (Insulin-like growth factor binding protein 1) mRNAs was measured. The primer pairs used were 5'-TCTATGGCGCTGAGATTGTG-3' (forward) and 5'-CTTAATGTGCCCGTCCTTGT-3' (reverse) for Akt 1, 5'-TGAAAACCTTCTGTGGGACC-3' (forward) and 5'-TGGTCCTGGTTGTAGAAGGG-3' (reverse) for Akt 2, 5'-TGAAGTGGCACACACTCTAACT-3' (forward) and 5'-CCGCTCTCTCGACAAATGGA-3' (reverse) for Akt 3, 5'-AAAGGATCGCCATGGAAAG-3' (forward) and 5'-GCACAGGAGCAGGTTTGAC-3' (reverse) for prolactin and finally 5'-TTTTACCTGCCAAACTGCAACA-3' (forward) and 5'-CCCATTCCAAGGGTAGACGC-3' (reverse) for IGFBP1. Human β-actin was used as an internal control and the primers used were 5'-CCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3' (forward) and 5'-ACGTCACACTTCATGATGGA-3' (reverse). Each reaction mixture (final volume, 25 µL) contained OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with

Standard buffer (12.5 μ L) from NEW ENGLAND BioLabs, (Whitby, ON, Canada), 10 μ M forward primer (0.5 μ L), 10 μ M reverse primer (0.5 μ L), cDNA (2 μ L) and nuclease-free water (9.5 μ L). PCRs were performed in C1000 Touch™ Thermal cycler, a Bio-Rad system, following these specific parameters: 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 s at 68°C for 24 cycles (β -actin), 32 cycles for Akt 1, Akt 2 and Akt 3 and 33 cycles for IGFBP1 and prolactin. The PCR products obtained were separated through electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with SYBR-Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA) and visualized with Gel Doc system (Bio-Rad). Real time PCR analyses were conducted using SensiFAST SYBR® Lo-ROX Kit (Bioline Reagents, MA) using an Mx3000P system (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada). For each gene target, a standard curve was generated to determine the efficiency of the reaction, and the Pfaffl analysis method was used to measure the relative quantity of gene expression. Each real time PCR was performed in duplicates from at least three independent experiments. The above-described human prolactin, Akt1, Akt2, Akt3 primers were used; however, a sense primer 5'-TTGGGACGCCATCAGTACCTA-3' and antisense primer 5'-TTGGCTAAACTCTCTACGACTCT-3' was used for IGFBP1. Either 18S with primer 5'-TGGTCGCTCGCTCCTCTCCC-3' (forward) and 5'-CAGCGCCCGYCGGCATGTAT-3' (reverse) or human β -actin were used as a reference gene based on their stable expression in all cell clones as an internal control. The Pfaffl method of quantification was used to measure relative expression.

Production of HIESC cell lines with Tet-inducible constitutive active Akt isoforms

All three myristoylated Akt isoforms were cloned separately into pLVX-Tet3G-puro vector (Clontech) by InFusion Cloning (NEB). Briefly, first each Myr-Akt was PCR-amplified using specific primers with sequence homologous to each side of the construct. For sequence template for Myr-Akt, constitutively active (CA) Akt1 vector (pcDNA3-Myr-Akt1) was generously provided by Dr. Zhenguo Wu (Hong Kong University of Science and Technology). For Myr-Akt2 sequence template CA-Akt2 vector (pcDNA3-Myr-Akt2) was generously provided by Dr. Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). For Myr-Akt3, we used the CA-Akt3 vector (pcDNA3-Myr-Akt3) constructed in our laboratory [27] as template. Each PCR fragment was inserted in the

pLVX-Tet3G-puro vector linearized by restriction digestion and cloned as InFusion manufacturer's instruction (Clontech). Vector were amplified in NEB Stable E.Coli and purified by MidiPrep (QIAGEN). These 3 new vectors and the pLVX-EF1a-Tet3G, were used to produce lentivirus with the Lenti-X 293T cell line and Lenti-X™ Lentiviral Expression Systems (Clontech). HIESC cells were cultured in maintenance medium and then plated 3×10^5 cells per wells. Media was removed and replaced by media containing a combination of EF1a-Tet3G lentivirus and either Myr-Akt1, Myr-Akt2 or Myr-Akt3 lentivirus in the presence of 5.4 ug/ml retronectin, and incubated for 24 hrs at 37°C in 5%CO₂. Then, media was refreshed and 24hrs of recovery later, a pool of transduced cells were selected in the presence of 100ug/ml G418 and 0.05ug/ml puromycin. Doxycycline-induction of Myr-Akt1, 2 and 3 isoforms in these cells in culture was confirmed by western blots using Akt1, 2 or 3 antibody and p-Akt(Ser473) antibody.

In vitro decidualization of Tet-inducible HIESC cell lines

HIESC-Myr-Akt1, HIESC-Myr-Akt2 or HIESC-Myr-Akt3 cells were cultured in maintenance medium and then plated 5×10^5 cells per wells. Confluent monolayers were treated in phenol red-free RPMI 1640 (gibco® by life technologies™) containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS) and 50µg/ml of gentamycin with or without 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA to induce decidualization. For Tet3G induction of Myr-Akt isoforms, 1ug/ml doxycycline was added to the culture media in appropriate wells. The culture medium was changed every two days and cells were grown at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂, RNA from cells was harvested at days 3 and used for qPCR analysis of decidualization markers.

Wound healing assay

Cells were seeded into six-well plates and allowed to grow in maintenance medium until they reached 90% confluence. Cells monolayers were scratched with the blunt end of a standard p10 pipette tip and dislodged cells were washed away with PBS. Cells were then incubated in phenol red-free RPMI containing 2% dextran coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS), 50 µg/ml of gentamycin and one of the following: for decidualization

induction: 0,5 mM 8-bromo-cAMP and 1 μ M MPA, for PI3K inhibition: 1 μ M Wortmannin, for mTOR inhibition: 100 nM Rapamycin. Migration was captured using an Olympus microscope at 0, 6, 12, and 24h post-wounding. Wound closure was quantified as the percentage of recovered area using Image J software.

Immunofluorescence

Cells were seeded in 6-wells containing glass coverslips. After treatment, cell were fixed for 10 minutes in 4% PFA and then washed in PBS (pH7.2) for 10 minutes thrice. Cells were then permeabilised with 0.1% Triton X-100 PBS for 10 minutes and then washed in pH7.2 PBS for 10 minutes thrice. Cells were incubated overnight, in dark conditions, at 4°C with either p65 primary antibody (8242) (Cell Signaling, Danvers, MA), Par-4 primary antibody (HPA012640) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) or the control Rabbit IgG (I-1000) (Vector Labs, Burlingame, CA) at the relevant concentration. Cells were then washed thrice in PBS and incubated at room temperature for 90 minutes in presence of Alexa Fluor 555 anti-rabbit antibodies (A21428) (Thermo Scientific, Rockford, IL). Cells were washed once using PBS and then counterstained with Alexa Fluor 488 Phalloidin (A12379) for 20 minutes at room temperature in dark conditions in order to mark F-actin; cells were again washed once using PBS and finally counterstained with Hoechst 33248 (1:10000 dilution) for 5 min and washed twice with PBS. Slides were then mounted using Slowfade gold antifading reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL) and viewed using a TCS SP8 Leica confocal microscope at 63x. A full description of antibodies, catalog numbers and concentration can be found in S1 Table.

Statistical analysis

All the experiments were repeated three times. Densitometric analyses were performed using Quantity One software (Bio-Rad). All data were either subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 5.0; GraphPad, San Diego, CA) followed by Tukey's test or Student's t-test to determine the differences between the experimental groups. Differences were considered significant at the level of $p < 0.05$.

Results

Decidualization of HIESC

MPA and cAMP are known inducers of decidualization in endometrial stromal cells, a process upon which the stromal cell adopts an epithelioid phenotype. To confirm that the decidualization process occurred using cAMP and MPA treatment in HIESC cells, we analyzed cell morphology and measured the production of known well-characterized decidual markers (IGFBP1 and PRL). Upon concomitant treatment of cAMP and MPA, we observed a clear morphological change characteristic of decidual cells (Fig 3.1A). Cells became enlarged, somewhat polygonal, and full of lipids and glycogen. The usually spindle-shaped stromal cells differentiated into ovoid cells displaying abundant cytoplasm; the sum of these changes can be described as a transition from mesenchymal to epithelial shape. We also measured mRNA expression of the decidual gene marker IGFBP1. Densitometric analyses of qRT-PCR analysis revealed a significant increased expression of IGFBP1 (Fig 3.1B) mRNA following cAMP+MPA treatments; on the other hand, the decidualization treatment significantly stimulated the secretion of PRL, a decidual marker of crucial importance, to its maximum on day 6 ($12,69 \pm 2.07$ ng/mL) then PRL decreased to reach $5,55 \pm 2,04$ ng/mL on day 9 (Fig 3.1C). Finally, in order to ascertain that the increased expression of PRL and IGFBP1 mRNA was truly caused by the concomitant use of both cAMP and MPA and not their singular use, further RT-qPCR experiments were conducted. The effect of single administration of cAMP (0.5mM), MPA (1 μ M) and their combination was compared and mRNA expression of IGFBP1 and PRL was measured (Fig 3.1D); both markers were shown to be significantly increased only in the context of the combined use of cAMP and MPA. Together, these results strongly suggest that the combined use of cAMP and MPA is effective and indispensable in inducing decidualization in HIESC cells. The obtained results also suggested that day 3 of decidualization was optimal for further experiments, considering that prolactin secretion and IGFBP1 expression were optimal.

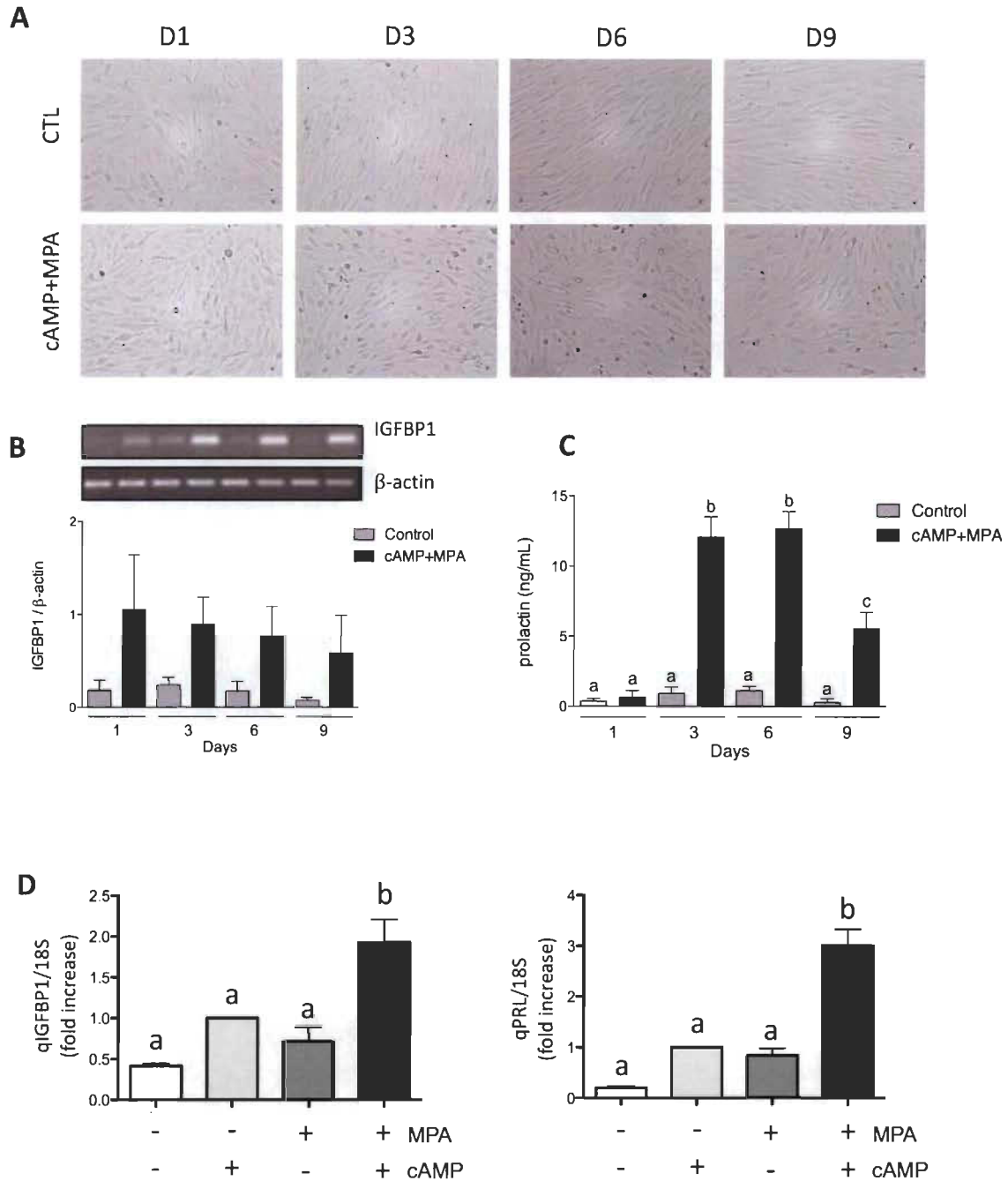


Figure 3.1

Induction of decidualization.

(A) Treatment with cAMP (0.5 mM) and MPA (10^{-6} M) for 9 days induced a morphological change in HIESC from a spindle to an ovoid shape. Images were taken using an Olympus BX60 microscope at 40x magnification. (B) mRNA were analysed by RT-PCR. β-actin was used as an internal control. Image shown are from one representative experiment. Graphics represent densitometric analysis. (C) Induction of PRL secretion by the same treatment in HIESC at different days of culture (1, 3, 6 and 9). A significant increase was found at days 6 and 10 with maximal levels observed at day 6 ($P < 0.0001$). Expression of

decidual marker genes, IGFBP1 (D) mRNA expression of either PRL or IGFBP1 were quantified following three day treatments. Cells were incubated in the presence of either cAMP (0.5 mM), MPA (10 μ M) or a combination of both. Cells were lysed after three days, RNA was extracted and qRT-PCR analyses were performed to quantify PRL or IGFBP1 expression. 18S mRNA expression was used as control for qPCR results. All data are means \pm SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($p < 0.05$).

Expression of Akt isoforms during in vitro decidualization

We previously demonstrated that the PI3K/Akt pathway is crucial in the rat endometrium for cell survival [16, 17]; we thus sought to determine the expression and activity of Akt during MPA+cAMP induced decidualization. We found that protein level of each Akt isoform was decreased with the induction of decidualization, although with various levels of significance depending on the length of the treatment (Fig 3.2A). Additionally, we observed a decrease in total Akt and a sharp, significant decrease in phosphorylated Akt on serine 473 (pAkt (ser473)) (Fig 3.2A). Although some results did not attain statistical significance, a clear trend appeared in every experiment. Since decidualization is a process known to alter cell dynamics, we endeavored to evaluate the effect of decidualization on cell proliferation and viability. To this end, we proceeded to count cells after three days of cAMP+MPA treatment to evaluate the effect of decidualization on growth, and subsequent viability. We found that decidualization modestly reduced cell proliferation and slightly increased cell death, although in a non-significant manner (Fig 3.2B). In an effort to ascertain whether the observed protein regulations were on a cell-by-cell basis, we proceeded to decidualize HIESC cells for three days; lane loads were normalized using absolute cell counts instead of β -actin. The results showed an important, as well as significant, decrease in total Akt, pAkt (ser473) and Akt1 (Fig 3.2C); however, as hinted by our previous experiments, Akt2 and Akt3 protein levels stayed mostly unchanged (densitometric analysis not shown). Taken together, these results suggest that, on a cell-by-cell basis, decidualization reduces Akt1 levels as well as Akt activation. In order to ascertain whether the agents used for the induction of decidualization were capable of modulating these proteins in a similar fashion, we treated HIESC with either cAMP (0.5mM), MPA (1 μ M) or a combination of both (Fig 3.2D). The obtained results suggested that cAMP was capable of significantly decreasing both

Akt and pAkt. On the other hand, MPA significantly increased pAkt(473), but this upregulation was abrogated by the combination of cAMP and MPA. Interestingly, while not statistically significant, Par-4 showed a slight tendency to be downregulated by the concomitant use of cAMP and MPA and FoxO1 levels followed an upward trend. Our team recently uncovered that Par-4, a pro-apoptotic protein, acted as a cell differentiation modulator in endometrial cancer cells. After nuclear localization, Par-4 induced EMT-like phenotype and molecular alterations [28]; it is also well known that FoxO1 localization is crucial to its activity. We addressed the interrogation of whether these proteins undergo nuclear translocation further in this manuscript. To assess the mechanism responsible for this degradation we used Mg132, a proteasome inhibitor. Although the Mg132 was effective in inhibiting the proteasome activity (Fig 3.3A), this inhibition did not allow the recovery of total Akt protein levels nor Akt phosphorylation following cAMP+MPA treatments (Fig 3.3B); further experiments also revealed that no changes could be observed in an isoform-specific manners and that Mg132 again failed to oppose the decidualization-induced loss of Akt isoforms (Fig 3.3C). Interestingly, RT-PCR analysis demonstrates that mRNA expression of those isoforms was not decreased (Fig 3.3D). These results suggest that the reduced Akt levels but unchanged transcripts levels strongly suggest that decidualization is accompanied by a degradation of Akt. Taken together, these results confirm that cAMP+MPA induced decidualization reduces Akt1 and Akt2 isoforms level and activity and that this degradation and loss of phosphorylation is not mediated by the proteasomal degradation pathway nor through transcriptional regulation of Akt isoforms expression.

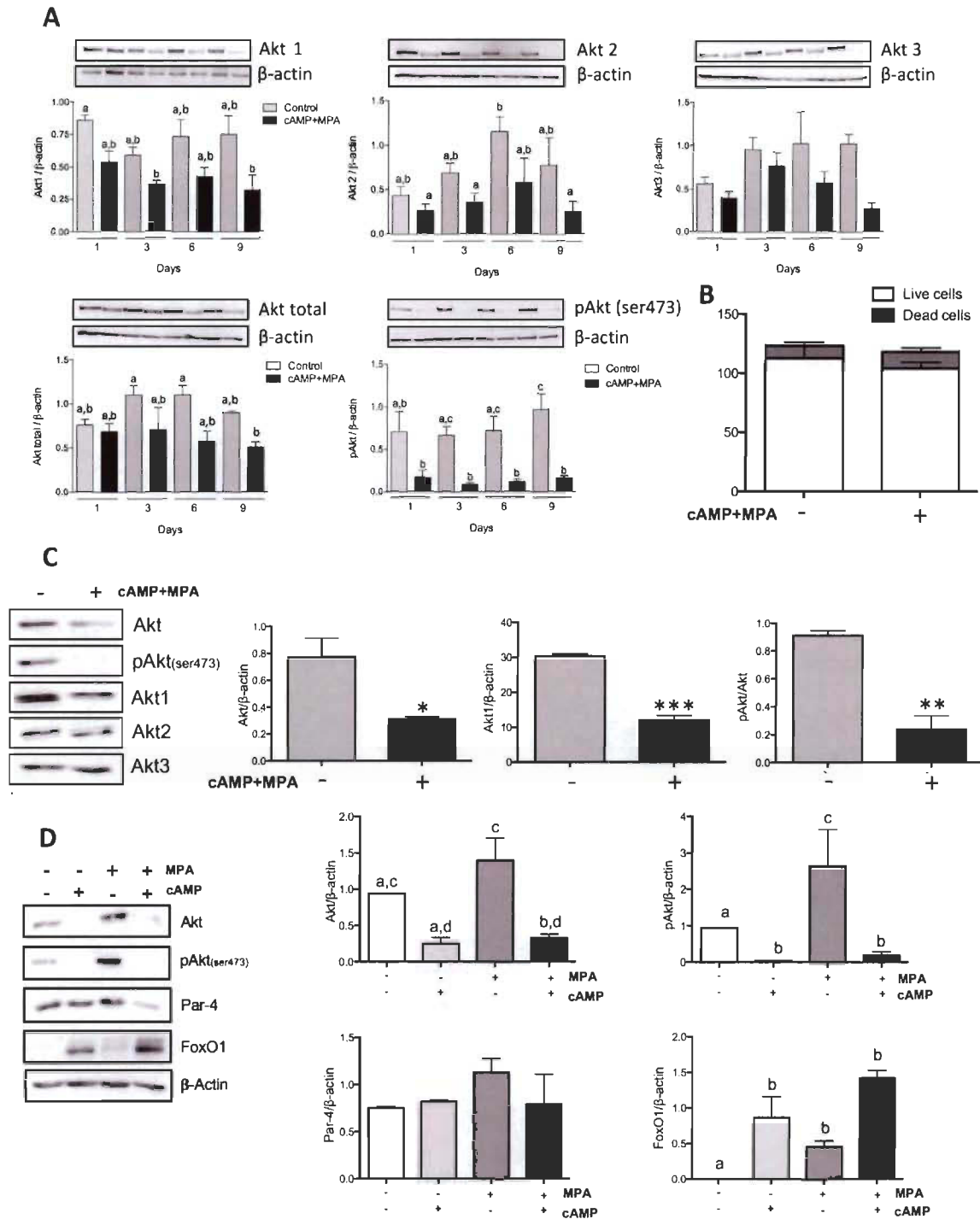


Figure 3.2

Expression of Akt isoform, total Akt and pAkt during induction of decidualization.

Cells were incubated in the presence or absence of cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) for a total of nine days. Total protein and RNA were then extracted. (A) Western blot was performed to quantify the change in specific Akt isoforms levels as well as total Akt levels. pAkt(ser473)

was used to assess Akt activation β -actin was used as loading control. (B) Cells were counted after three days in either control media or under cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) treatment to assess the effect of decidualization on proliferation. Trypan blue exclusion dye was used to assess the number of dead cells in the samples. (C) Cells were incubated in the presence of cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) treatment for three days; they were then counted; an equal amount of cells were lysed and subsequently loaded to perform Western blot analysis. Changes in total Akt, specific Akt isoforms as well as phosphorylated Akt (ser473) was quantified. (D) Cells were incubated in the presence of either cAMP (0.5 mM), MPA (10 μ M) or a combination of both. Cells were lysed after three days and total proteins were extracted. Western blot was performed to quantify the change in total Akt, pAkt(ser473), Par-4 or FoxO1; β -actin was used as loading control. All blots shown are from one representative experiment. All graphics represent Western blot densitometric analysis. All data are means \pm SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($p < 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

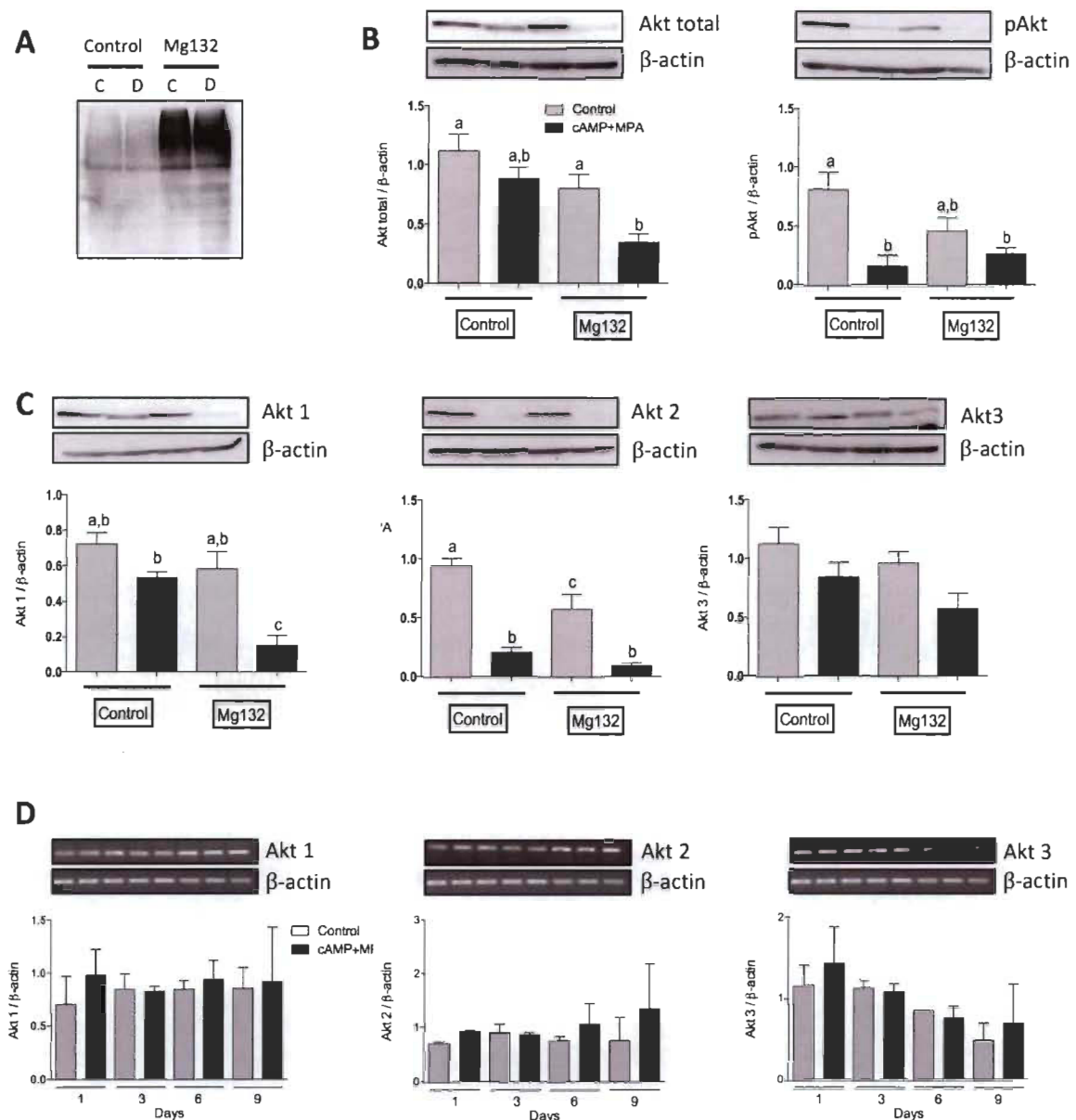


Figure 3.3

In vitro modulation of PI3K/Akt pathway with the induction of decidualization.

Induction of decidualization was induced with cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) for 48h, then MG132 was added and incubated for another 24h. (A) Treatment using Mg132 increased total ubiquitination, both in control conditions and decidualized cells, indicating that the Mg132 was effective at inhibiting proteasomal degradation. (B) Total Akt and pAkt levels were measured by Western blot. (C) Individual Akt isoforms levels were assessed by Western blot. β -actin was used as loading control. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometric analysis. (D) RT-PCR was performed for each Akt isoforms to evaluate change in mRNA transcription. Data represent means \pm SEM for three independent

experiments. β -actin was used as an internal control. Image shown are from one representative experiment. Graphics represent densitometric analysis. All data are means \pm SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($p < 0.05$).

In vitro modulation of PI3K/Akt activity and other pathways upon induction of decidualization

Results obtained from the previous experiments suggested that decidualization diminished Akt phosphorylation, and thus, activity. To ascertain this hypothesis, the PI3K/Akt pathway activity was evaluated by measuring the expression and activation (phosphorylation) of Akt, the main regulator of this pathway but also by measuring the phosphorylation of natural substrates of Akt; considering that Akt is known to directly activates mTOR [29], we measured the phosphorylation level of mTOR as an indicator of Akt activity. Upon cAMP+MPA treatments, we observed an increase in the levels of phosphorylated mTOR only in the control while the phosphorylation levels of mTOR remained unchanged in the treated cells (Fig 3.4A); while the result attained statistical significance only on day 9, a clear trend can be observed. Interestingly, some of the changes observed in the phenotype of stromal cell are reminiscent of mesenchymal to epithelial transition (MET). In order to evaluate whether classical EMT markers were involved in this change, we assessed the change in Slug, a transcription factor known to regulate epithelial to mesenchymal transition (EMT); Slug was found to be significantly decreased upon decidualization (Fig 3.4B). However, no significant regulations could be observed in the levels of Snail and E-Cadherin (results not shown); this suggests that, upon decidualization, HIESC cells undergo some form of, albeit incomplete, MET-like process. The obtained results, however, are insufficient to fully characterize this process.

We then further investigated the regulation of signaling cascades that might be regulated by the modulation of PI3K/Akt pathway observed during decidualization. Akt regulates the activity of the NF- κ B through the activation of IKK, which phosphorylates I κ B, allowing nuclear entry of NF- κ B. We observed an increase in the phosphorylation of I κ B (Fig 3.4C). This result suggests that a PI3K/Akt-independent activation of the NF- κ B occurs in decidualization. Again, considering the clear trend observed in the phosphorylation of I κ B, we endeavored to establish whether the magnitude of these

changes would be different on a cell-by-cell basis; using absolute cell count as to normalize lane loads, we found that the increase in I κ B phosphorylation, when compared to total I κ B, was highly significant (Fig 3.4D). Finally, in order to confirm that the induction of decidualization was crucial for the phosphorylation of I κ B, we again conducted experiments using cAMP and MPA both singly or in combination. The obtained results showed a significant and substantial increase in relative I κ B phosphorylation solely in the context of concomitant use of both agents. These results suggest that decidualization induces the activation of the NF- κ B pathway through the inactivation and subsequent degradation of its main repressor, I κ B. We are also allowed to think that the combination of both agents is crucial for this pathway to be activated and is characteristic of successful decidualization.

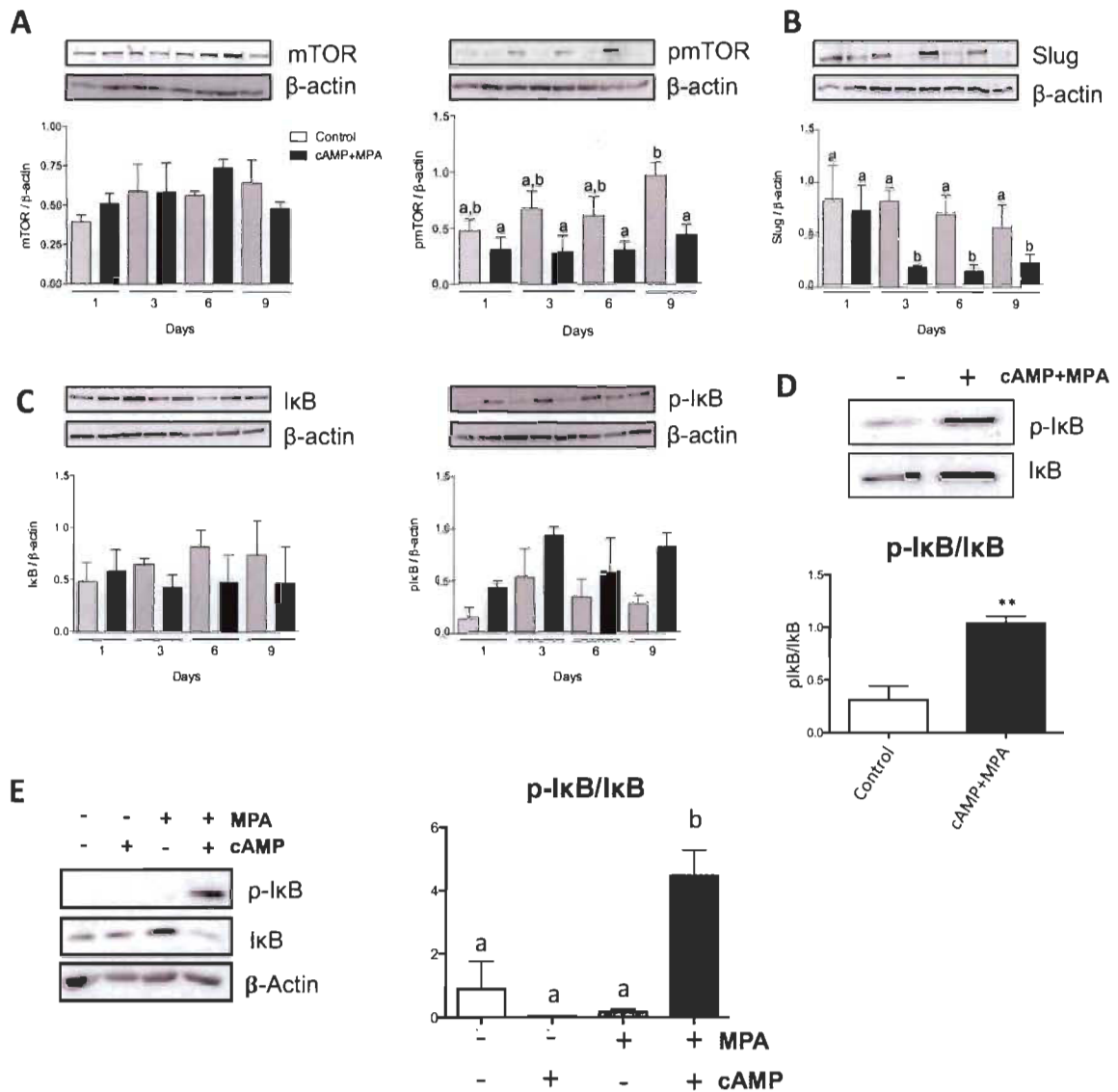


Figure 3.4

In vitro modulation of PI3K/Akt pathway and their effects with the induction of decidualization.

Cells were incubated in the presence or absence of cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) for a total of nine days. mTOR and pmTOR protein expression (A), Slug protein expression (B) and I κ B/pI κ B protein expression (C) and were measured during decidualization. Total proteins were collected on different days of decidualization. β -actin was used as loading control. Blots shown are from one representative experiment. (D) Cells were harvested after three days of cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) treatment; they were then counted; an equal amount of cells were lysed and subsequently loaded to perform Western blot analysis. Changes in total I κ B and phosphorylated I κ B was quantified. (E) Cells were incubated in the presence of either cAMP (0.5

mM), MPA (10 μ M) or a combination of both. Cells were lysed after three days and total proteins were extracted. Western blot was performed to quantify the change in total I κ B and p-I κ B; β -actin was used as loading control. Presented Western blots are from one representative experiment. All graphics represent Western blot densitometric analysis. All data are means \pm SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($p < 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Effect of decidualization on Par-4 and p65 localization

Results obtained in the previous experiments strongly suggested that decidualization induced I κ B phosphorylation, which is a marker for NF- κ B activation. While not significant statistically, we observed slight Par-4 and FoxO1 modulation; as we previously demonstrated that nuclear Par-4 was a regulator of cell differentiation, we investigated its localization following decidualization. We first performed cytoplasmic/nuclear extraction to evaluate protein enrichment in both compartments in the context of day 3 decidualized HIESC cells (Fig 3.5A). Our results suggest that, upon decidualization, Par-4 is displaced from the nucleus while both p65 and FoxO1 are imported in the nuclear compartment. While FoxO1 displacement was well predictable, we sought to confirm our results for Par-4 and p65. To this end, we performed immunofluorescence again on day 3 decidualized cells (Fig 3.5B). Our results confirmed the clear displacement of Par-4 to the cytoplasm concomitant with the entry of p65 in the nucleus. Together, our results suggest that decidualization induces FoxO1 localization to the nucleus, Par-4 displacement from the nucleus to the cytoplasm and p65 entry in the nuclear compartment where its activation takes place.

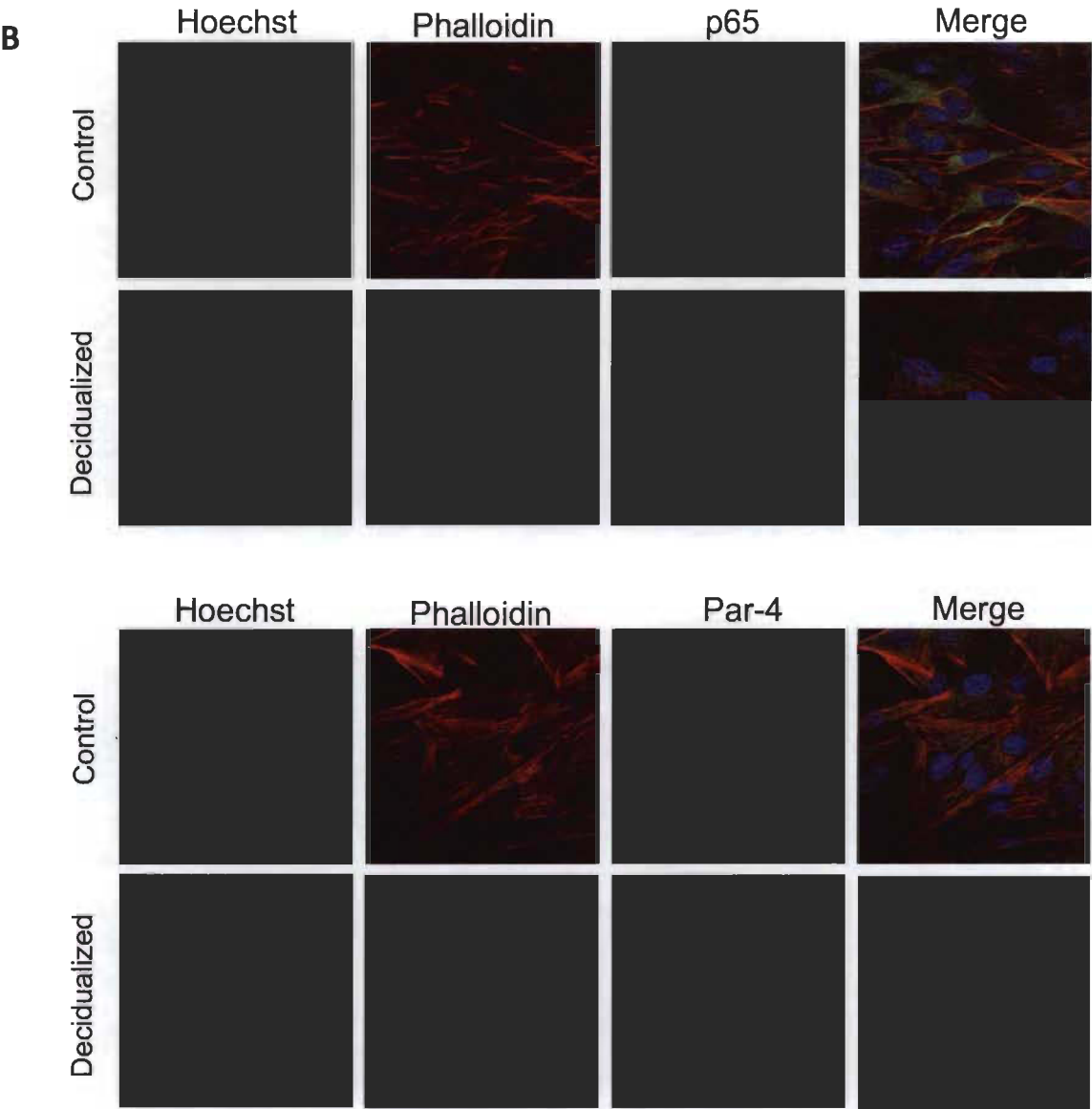
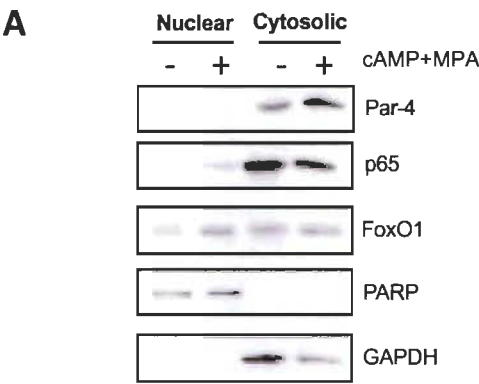


Figure 3.5 Subcellular localization of proteins following decidualization. Decidualization was induced with cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) for three days (A) Cells were then harvested and cytoplasmic/nuclear extraction was performed following manufacturer protocol. Western blot was performed to qualify the change in Par-4, p65 and FoxO1. PARP was used as nuclear fraction control while GAPDH was used as cytoplasmic fraction control. The presented blot is of one representative experiment. (B) HIESC were seeded in 6-wells containing coverslips and grown in presence of cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M) for three days. p65 and Par-4 localization were then observed by confocal microscopy. Presented images are of one representative experiment.

Effect of PI3K/Akt pathway inhibition on cell motility

The ability of the PI3K/Akt pathway to influence cell migration is well-documented [19]; the importance of cell motility during the embryo implantation is also recognized [30]. To evaluate the modulation of cell motility in our model, we performed a wound healing assay on decidual endometrial stromal cells. We noticed that the cAMP and MPA treatment significantly reduced cell motility, as shown by the failure of cAMP+MPA treated cell to close the created wound (Fig 3.6A). We then sought to understand whether Akt loss, observed in the preceding experiments upon cAMP+MPA induced decidualization, was responsible for this change in cell motility. We treated the HIESC with Wortmannin, a PI3K inhibitor, and rapamycin, an mTOR inhibitor. We observed that the inhibition of the PI3K pathway by Wortmannin significantly reduced cell motility in a way very similar to the effect of cAMP+MPA induced decidualization (Fig 3.6B). However, rapamycin failed to reduce cell motility in endometrial stromal cells. These results, coupled with the knowledge that decidualization modestly modulates cell proliferation after three days (Fig 3.2B), suggest that the decreased cell motility observed during decidualization seems to be associated with PI3K/Akt, independently of the mTOR pathway activity and proliferative variables.

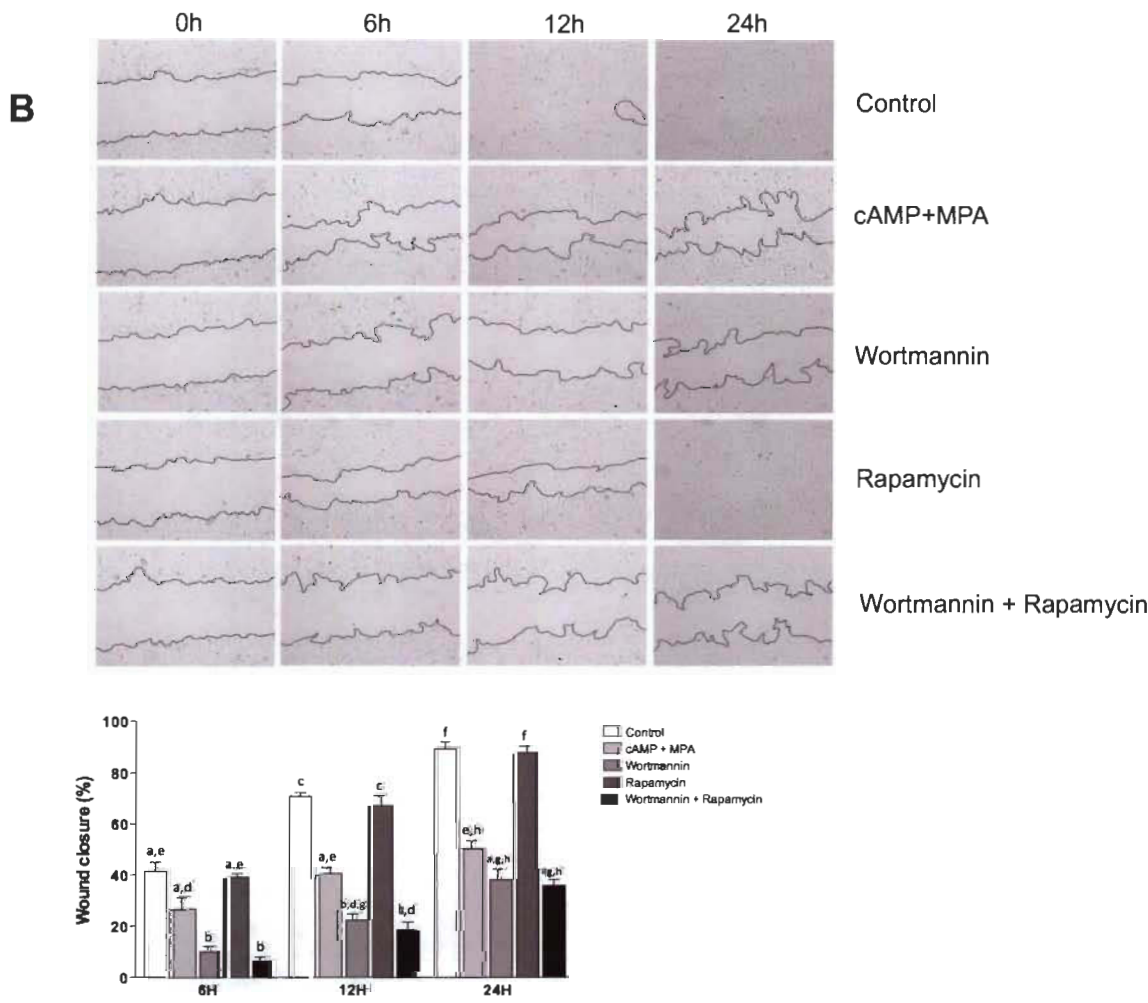
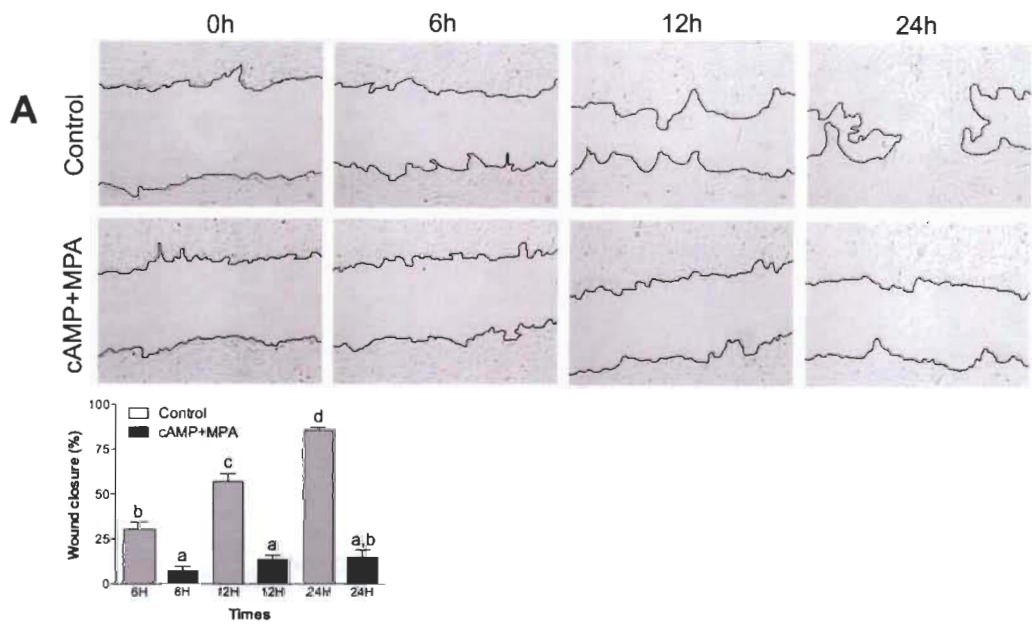


Figure 3.6 Decidualization and inhibition of PI3K/Akt pathway reduces cell motility.

(A) Wound healing assays were performed using HIESC treated with either vehicle or cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M). HIESC were allowed to grow until they reached confluence; cells monolayers were then scratched with the blunt end of a tip and images were captured at 0, 6, 12 and 24h postwounding in order to assess cell motility. Wound closure was quantified as the percentage of recovered area. (B) Wound healing assays were performed using HIESC treated with either vehicle or cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M). HIESC were allowed to grow until they reached confluence; cells monolayers were then scratched with the blunt end of a tip and images were captured at 0, 6, 12 and 24h postwounding in order to assess cell motility. Treatment consisted of either vehicle (control), cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M), 10 μ M Wortmannin (PI3K inhibitor) or 100 nM Rapamycin (mTOR pathway inhibitor) or combinations of these compounds. Wound closure was quantified as the percentage of recovered area. Data are means \pm SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($p < 0.05$). Images were taken using an Olympus BX60 microscope at 40x magnification.

Effect of constitutive active Akt isoforms on the decidualization process

To investigate the effect of specific Akt isoforms on the decidualization process, we produced Tet-On vectors capable of expressing, upon doxycycline treatment, a constitutively active form of each Akt isoforms. The constitutive activation of Akt was achieved through the use of a myristoylation signal allowing forced localization of Akt to the membrane and facilitating its phosphorylation by its effectors. The experiment was conducted either treating the cells concomitantly with dox (to induce Akt expression) and cAMP+MPA (to induce decidualization) or the cells were decidualized and dox was applied 24h later. We decided to use these two treatment regimens in order to differentiate the effect on Akt on initialization and sustainment of decidualization. In both cases, the cells were lysed on day three and qRT-PCR was performed to quantify PRL (prolactin) mRNA expression, as a marker of successful decidualization; our experiments show that the overexpression of either Akt1 or Akt2 significantly decreased the expression of PRL while Akt3 displayed no such effect (Fig 3.7A); similar results were found when quantifying IGFBP1 mRNA expression (Fig 3.7B), further validating the inhibitory effect of Akt1-2 isoforms on the induction of decidualization. Finally, we confirmed the significant overexpression of specific Akt isoforms by quantifying their respective mRNA

expressions following doxycycline treatments (Fig 3.7C). Altogether, the obtained results clearly show that the timing of Akt expression does not influence the change in PRL expression. Finally, our results suggest that Akt1 and Akt2 oppose decidualization while Akt3 is uninvolved in this process.

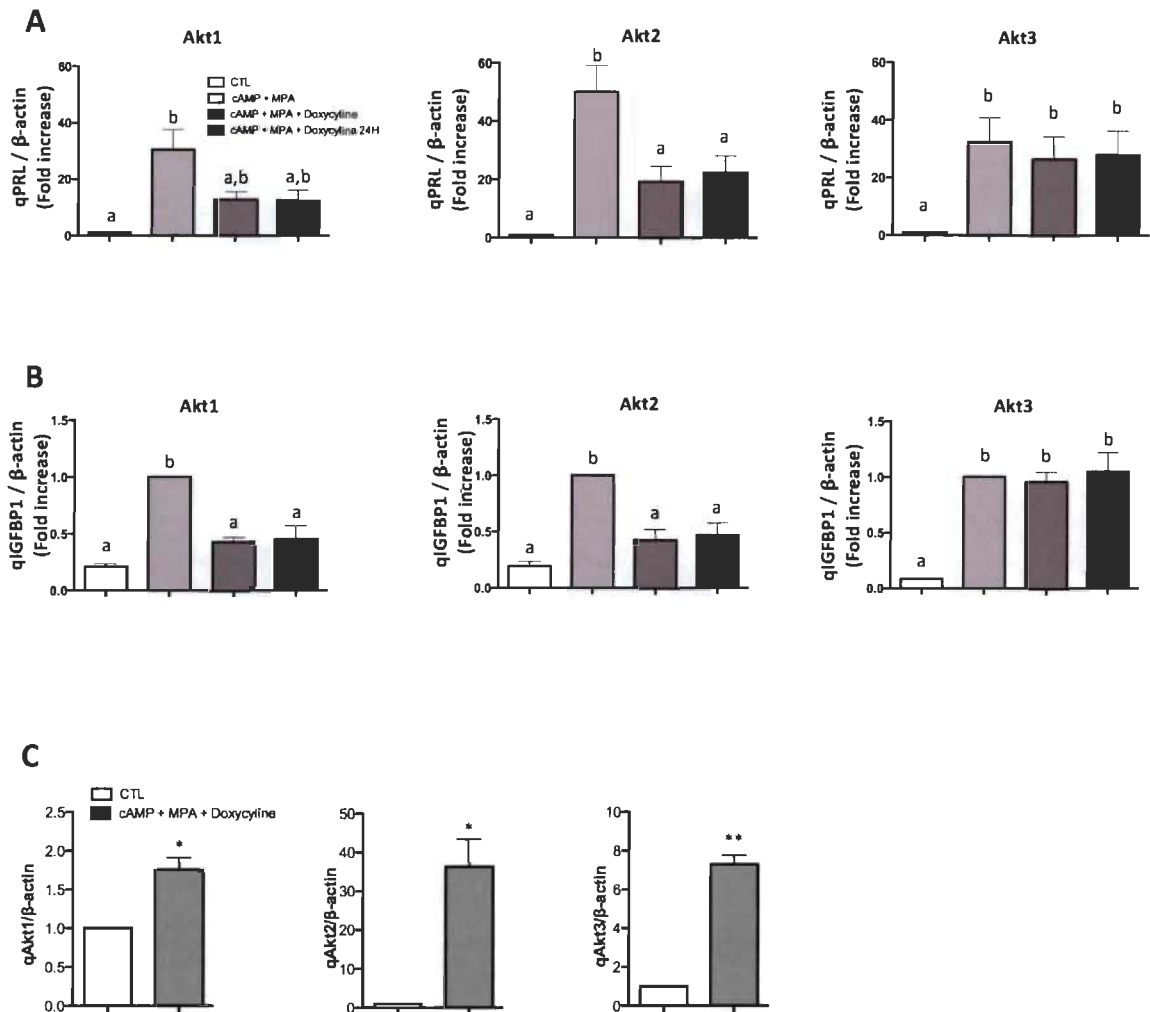


Figure 3.7

Effect of forced expression of Akt isoforms (CA-Akt) on PRL and IGFBP1 expression.

mRNA expression of either PRL (A) IGFBP1 (B) were quantified following three days treatments. HIESC cells transfected with either Akt1, Akt2 or Akt3 Tet-On vectors were subjected to decidualization using cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M). They were then either concomitantly treated with doxycycline (1 μ g/mL) in order to induce the expression of the constitutive Akt isoform construct (cAMP+MPA+Doxycycline) or cells were allowed to decidualize for 24h before doxycycline was added (cAMP+MPA+Doxycycline 24H).

Cells were lysed after three days and qRT-PCR analyses were performed to quantify PRL or IGBP1 expression. β -actin mRNA expression was used as control for qPCR results. (C) Akt 1, Akt2 and Akt3 expression was quantified following three days treatments. HIESC cells transfected with either Akt1, Akt2 or Akt3 Tet-On vectors were subjected to decidualization using cAMP (0.5 mM) and MPA (10 μ M). They were then either concomitantly treated with doxycycline (1 μ g/mL) in order to induce the expression of the constitutive Akt isoform construct (cAMP+MPA+Doxycycline). Cells were lysed after three days and qRT-PCR analyses were performed to quantify Akt1, Akt2 or Akt3 expression. β -actin mRNA expression was used as control for qPCR results. Data are means \pm SEM three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($p < 0.05$).

Discussion

Decidualization is an important event in the uterus to allow implantation. When endometrial stromal cells undergo decidualization, they differentiate and many signaling pathways are affected; the inducement of these changes can be noted by the secretion of decidual markers is induced and morphological changes are observed. cAMP and MPA co-treatment on endometrial stromal cells is associated with cell cycle arrest at G0/G1 phase initially and G2/M phase at later stages to permit differentiation of the treated cells [31]. This cell cycle arrest during decidualization can affect many pathways, in particular survival pathways, such as PI3K/Akt, one of the most pivotal pathways in determining cell fate. The aim of the present study was to characterize the expression of the PI3K/Akt survival pathway in the human endometrial stromal cells during decidualization in vitro.

Our study establishes that activity of Akt, as well as total protein levels, were reduced following induction of decidualization; these changes, interestingly, were isoform-specific. We demonstrated that this decrease in Akt isoforms protein levels did not involve ubiquitin-proteasome degradation. The identity of the degradation system responsible for this effect during decidualization remains unknown. The decreased activity of PI3K/Akt pathway during decidualization could affect downstream pathways responsible for cell differentiation. In the context of decidualization, fibroblasts undergo radical changes in order to adopt an epithelial-like phenotype; it is highly plausible that Akt regulates such changes in the context of decidualization. In a recent study,

constitutively active Akt were expressed in squamous cell carcinoma lines and they underwent EMT. The induction of EMT was characterized by down-regulation of epithelial markers desmoplakin, E-cadherin, and β -catenin, and up-regulation of the mesenchymal marker vimentin. Those constitutively active Akt cells also exhibited reduced cell-cell adhesion, increased motility on fibronectin-coated surfaces, and increased invasiveness in animals [32]. A decrease in PI3K/Akt pathway will conduct to the reverse phenotype of this phenomenon called mesenchymal to epithelial transition (MET). When the cells undergo MET, they let go of their fibroblast-like properties and acquire epithelial cells characteristics. The morphological changes that we observed following induction of decidualization concord with this phenotype. Multiple studies have already characterized the molecular changes associated with MET phenotype switch in the process of decidualization [6–8]; however, in these studies, non-immortalized human cells were gathered from patients and treated using estradiol. Finally, some of the strongest evidence shown in these studies are drawn from mice cells, which could further explain the discrepancies observed with our results; while we observed a decrease in Slug protein level, which indicates that decidualization is accompanied by the induction of a MET-like process, although incomplete. Finally, we also observed Par-4 displacement from the nucleus to the cytoplasm following decidualization; we have recently published data demonstrating that Par-4 mediates TGF- β induced EMT [28]; while further investigation is necessary to fully understand the role of Par-4 in this partial MET, its change in localization could be a pivotal modulator of cellular differentiation.

The Akt protein is a crucial regulator of migration through its control of actin organization, cell-to-cell adhesion, cell motility and extracellular degradation. In particular, Akt1 is known to increase fibroblasts motility by phosphorylating Girdin, an actin-binding protein essential for the integrity of the actin cytoskeleton and cell migration [33]. Phosphorylation of Girdin by Akt controls its association with plasma membrane and facilitates the lamellipodium formation. Akt1 also enhances matrix metalloproteinase-2 (MMP2) activity in mouse mammary epithelial cells and invasion [34]. This proteinase is responsible for extracellular matrix modification and known to degrade the matrix components. Moreover, the influence of Akt isoform 1 and 3 are known to influence cell

motility since a shRNA of those isoforms resulted in a decrease cell migration in trophoblast cells [30]. In this study, Akt 2 isoform did not result in increased or decreased cell motility. It is important to note that cell motility appears to be an important event in the successful implantation considering the invasive role of the trophoblastic cells. This motility is important in order for the implanting embryo to be fully encapsulated in the decidual tissue. The endometrial stromal cells can also affect this implantation process but it is not known how the cell motility is involved during decidualization. In our model, we observed both a decrease in cell motility, which leads to the idea that decidualization induces reduced levels of cell motility through that decreased levels of Akt isoforms. How this impacts the invasion process is still undetermined. Finally, mTOR is known to be reactivated upon cell starvation; the decidualization protocol requires the use of 2% dextran coated charcoal-treated FBS, which is far lower than the regular (10%) FBS concentration, known to contain estrogen analogs usually used in cell culture. These suggest that decidualization impedes the ability of the HIESC cells to activate the mTOR pathway in response to starvation stress, which could confer some level of resistance to autophagy [35].

Activation of PI3K/Akt is known to affect the synthesis of decidual markers[10]. During endometriosis where increase activity of this pathway is present, a decrease in the decidual marker (IGFBP1 and PRL) was observed [36]. An inhibition of Akt activity using LY294002, a PI3K inhibitor, resulted in an increase of IGFBP1 mRNA. Additionally, a majority of endometrial cancers present a mutation in PTEN or a decrease of its expression, causing an increased PI3K/Akt activity [37, 38]. Our results suggest that re-expression of those isoforms reduce the expression of IGFBP1 and PRL, two crucial markers of successful decidualization; we are thus allowed to think that Akt isoforms interferes with decidualization and that the negative regulation of Akt is necessary for the inducement of this phenotypical change. This decrease in Akt isoforms, and phosphorylated Akt, is concomitant with FoxO1 nuclear translocalisation; this is in line with the canonical series of event necessary for decidualization to occur. Interestingly, the loss of Akt activity and total protein levels were concurrent with the activation of the NF- κ B pathway through the phosphorylation of its inhibitory subunit I κ B. It is very well

accepted that phosphorylation of I κ B followed by nuclear entry of NF- κ B is fully synonymous with the activation of the NF- κ B transcription factor [39, 40]. While they all converge in the activation of IKK and the subsequent phosphorylation of I κ B, a multitude of pathways are capable of activating the NF- κ B system. One of the main actor of this regulation is, of course, the PI3K/Akt axis[41, 42]. However, considering the central role this pathway holds in cell fate, apoptosis regulation, differentiation and inflammation, the regulatory network of the NF- κ B pathway is fittingly intricate. Kinases such as the NF- κ B activating kinase (NIK), TGF- β activating kinase (TAK1) and MEKK1-2-3 can all mediate the activation of IKK [40, 43]; however, these signaling cascades are predominantly downstream of TNF- α , Toll-like receptors and interleukin signaling. In the context of our results, where we observe the inhibition of the Akt axis simultaneously with an upregulation of NF- κ B activity, it is conceivable that other signaling cascades are responsible. While Akt is a major modulator of NF- κ B activation, multiple members of the MAPK family are also involved in its regulation; JNK and p38 have been thoroughly investigated and their involvement is definite [40, 43]. Considering that the Akt axis can exert an inhibitory effect on various arms of the MAPK pathways [44, 45], the cessation of pAkt signaling could plausibly allow a signaling compensation. There is also a distinct possibility that Akt exerts an inhibitory effect on NF- κ B in the context of endometrial stromal cells, a paradoxical effect that has been shown in other contexts [46–48]. This hypothesis is interesting considering the tight regulation of inflammatory signaling during implantation, a process to which decidualization ultimately prepares; altogether, it is indisputable that further work is required to fully elucidate the nature of the molecular changes responsible for decidualization to occur.

The present study demonstrates that the PI3K/Akt has many effects during decidualization and that its forced expression interferes with this process. Considering the crucial role of this pathway in a plethora of both physiological and pathological mechanisms, our results suggest that the abnormal activity of the PI3K/Akt pathway could lead to unreceptive endometrium by impeding the orderly process of stromal decidualization.

Acknowledgments

Francois Fabi was holder of a FRQ-S PhD Scholarship and Kathy Grenier was holder of master scholarship from Réseau Québécois en Reproduction (RQR). We are grateful to Michel A. Fortier for the HIESC cells.

References

1. Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA, Tough S, Collins J. Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Hum Reprod*. 2012; 27(3):738–46. Epub 2012/01/20. PubMed Central PMCID: PMC3279129. <https://doi.org/10.1093/humrep/der465> PMID: 22258658
2. Brosens JJ, Takeda S, Acevedo CH, Lewis MP, Kirby PL, Symes EK, et al. Human endometrial fibro- blasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stim- ulus. *Endocrinology*. 1996; 137(6):2225–31. Epub 1996/06/01. <https://doi.org/10.1210/endo.137.6.8641169> PMID: 8641169
3. Tang B, Guller S, Gurpide E. Mechanism of Human Endometrial Stromal Cells Decidualization. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994; 734(1):19–25.
4. Zhang X-H, Liang X, Liang X-H, Wang T-S, Qi Q-R, Deng W-B, et al. The Mesenchymal–Epithelial Transition During In Vitro Decidualization. *Reproductive Sciences*. 2013; 20(4):354–60. <https://doi.org/10.1177/1933719112472738> PMID: 23302397
5. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investi- gation*. 2009; 119(6):1420–8. PubMed Central PMCID: PMC2689101. <https://doi.org/10.1172/JCI39104> PMID: 19487818
6. Zhang XH, Liang X, Liang XH, Wang TS, Qi QR, Deng WB, et al. The mesenchymal-epithelial transition during in vitro decidualization. *Reprod Sci*. 2013; 20(4):354–60. PubMed Central PMCID: PMCPMC4077516. <https://doi.org/10.1177/1933719112472738> PMID: 23302397
7. Yu J, Berga SL, Johnston-MacAnanny EB, Sidell N, Bagchi IC, Bagchi MK, et al. Endometrial Stromal Decidualization Responds Reversibly to Hormone Stimulation and Withdrawal. *Endocrinology*. 2016; 157(6):2432–46. PubMed Central PMCID: PMCPMC4891781. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1942> PMID: 27035651
8. Patterson AL, Zhang L, Arango NA, Teixeira J, Pru JK. Mesenchymal-to-epithelial transition contributes to endometrial regeneration following natural and artificial

- decidualization. *Stem Cells Dev.* 2013; 22 (6):964–74. PubMed Central PMCID: PMC3585744. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0435> PMID: 23216285
9. Daly DC, Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *American journal of obstetrics and gynecology.* 1983; 145(6):672–8. Epub 1983/03/15. PMID: 6829654
 10. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction.* 2014; 148(5):R85–95. Epub 2014/08/15. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0270> PMID: 25118299
 11. Tang B, Guller S, Gurpide E. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology.* 1993; 133(5):2197–203. <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404671> PMID: 8404671
 12. Brar A, Frank G, Kessler C, Cedars M, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocr.* 1997; 6(2):301–7.
 13. Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology.* 1999; 140(10):4809–20.
 14. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(2):151–61. Epub 2003/10/22. PMID: 14567882
 15. Telgmann R, Gellersen B. Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Human Reproduction Update.* 1998; 4(5):472–9. PMID: 10027598
 16. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1:47. PubMed Central PMCID: PMC161822. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-47> PMID: 12816542
 17. Veillette A, Grenier K, Brasseur K, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Parent S, et al. Regulation of the PI3- K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of reproduction.* 2013; 88(3):79. Epub 2013/02/08. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107136> PMID: 23390163
 18. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development.* 1999; 13(22):2905–27.

19. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cellular Signalling*. 2009; 21(4):470–6. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.11.015> PMID: 19110052
20. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On. *Cancer Research*. 2006; 66(8):3963–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0743> PMID: 16618711
21. Chen WS, Xu P- Z, Gottlob K, Chen M- L, Sokol K, Shiyanova T, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Development*. 2001; 15 (17):2203–8.
22. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(42):38349–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100462200> PMID: 11533044
23. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, NY)*. 2001; 292(5522):1728–31.
24. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, et al. Role for Akt3/Protein Kinase B γ in Attainment of Normal Brain Size. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25(5):1869–78. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005> PMID: 15713641
25. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000; 346 Pt 3:561–76. Epub 2000/03/04. PubMed Central PMCID: PMC1220886.
26. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*. 2005; 307(5712):1098–101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148> PMID: 15718470
27. Girouard J, Lafleur MJ, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecologic oncology*. 2013; 128(2):335–43. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.11.016> PMID: 23174537
28. Chaudhry P, Fabi F, Singh M, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Prostate apoptosis response-4 mediates TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis*. 2014; 5:e1044. PubMed Central PMCID: PMCPMC3944278. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.7> PMID: 24503536
29. Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, et al. A Direct Linkage between the Phosphoinositide 3-Kinase-AKT Signaling Pathway

- and the Mammalian Target of Rapamycin in Mitogen-stimulated and Transformed Cells. *Cancer Research*. 2000; 60(13):3504–13. PMID: 10910062
30. Haslinger P, Haider S, Sonderegger S, Otten JV, Pollheimer J, Whitley G, et al. AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans. *Biology of reproduction*. 2013; 88(3):54, 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.104778> PMID: 23303682
 31. Logan PC, Steiner M, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Cell Cycle Regulation of Human Endometrial Stromal Cells During Decidualization. *Reproductive Sciences*. 2012; 19(8):883–94. <https://doi.org/10.1177/1933719112438447> PMID: 22534328
 32. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, et al. The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines. *Cancer Research*. 2003; 63(9):2172–8. PMID: 12727836
 33. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Developmental cell*. 2005; 9(3):389–402. Epub 2005/09/06. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.08.001> PMID: 16139227
 34. Park BK, Zeng X, Glazer RI. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2001; 61(20):7647–53. Epub 2001/10/19. PMID: 11606407
 35. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. 2010; 584 (7):1287–95. PubMed Central PMCID: PMC2846630. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017> PMID: 20083114
 36. Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased Activation of the PI3K/AKT Pathway Compromises Decidualization of Stromal Cells from Endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012; 97(1):E35–E43.
 37. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet*. 1997; 17(2):143–4. Epub 1997/11/05. <https://doi.org/10.1038/ng1097-143> PMID: 9326929
 38. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, et al. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clinical Cancer Research*. 1998; 4(12):3005–10. PMID: 9865913
 39. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006; 25 (51):6680–4. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954> PMID: 17072321

40. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013; 42:443–68. PubMed Central PMCID: PMC3678348. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338> PMID: 23495970
41. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2009; 125(12):2863–70. PubMed Central PMCID: PMC32767458. <https://doi.org/10.1002/ijc.24748> PMID: 19609947
42. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF- {kappa}B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes & development.* 2008; 22 (11):1490–500. PubMed Central PMCID: PMC32418585.
43. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013; 12:86. PubMed Central PMCID: PMC3750319. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86> PMID: 23915189
44. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36(6):320–8. PubMed Central PMCID: PMC3112285. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006> PMID: 21531565
45. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40(1):139–46. <https://doi.org/10.1042/BST20110609> PMID: 22260680
46. Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF- kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol.* 2000; 1(6):533–40. <https://doi.org/10.1038/82797> PMID: 11101877
47. Zhao L, Lee JY, Hwang DH. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway negatively regulates Nod2- mediated NF-kappaB pathway. *Biochemical pharmacology.* 2008; 75(7):1515–25. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.014> PMID: 18243161
48. Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(35):32124–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203298200> PMID: 12052830

CHAPITRE IV

INHIBITION OF CRM1 ACTIVITY SENSITIZES ENDOMETRIAL AND OVARIAN CELL LINES TO TRAIL-INDUCED CELL DEATH

François Fabi, Pascal Adam, Keven Vincent, François Demontigny, Sophie Parent,
France-Hélène Joncas, Eric Asselin

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue Cell Communication and Signalling le 4 juillet 2018. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs.

4.1 Contribution des auteurs

François Fabi a conçu et effectué la majorité des expérimentations présentées dans l'article. François Fabi a écrit la totalité du manuscrit. Pascal Adam, étudiant au doctorat, a procédé à certaines expériences de Western blots. Keven Vincent et François Demontigny, lors de leurs stages de biologie médicale, ont accomplis certaines expériences de Western blots et de culture cellulaire. Sophie Parent, assistante de recherche, a aidé à la mise au point des protocoles et à la mise au point des techniques de PCR quantitatives. France-Hélène Joncas, étudiante à la maîtrise, a procédé à certaines expériences de localisation intracellulaire. Eric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et a supervisé l'élaboration et la conception expérimentale de ce manuscrit.

4.2 Résumé de l'article (français)

L'enrichissement en CRM1 est une indication de l'invasivité ainsi que du potentiel chimiorésistant des tumeurs. TRAIL, pour sa part, est une protéine antitumorale puissante, capable d'induire la mort cellulaire de façon spécifique dans les tumeurs. Toutefois, son

utilisation dans le contexte des cancers gynécologiques s'est soldé par un échec jusqu'à maintenant. Dans l'étude présentée, nous avons examiné si CRM1, un exportateur nucléaire capable de médié le transport protéique, pourrait agir comme une cible pharmacologique et dont l'inhibition permettrait de restaurer la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques. Nous avons donc exploré l'hypothèse voulant que l'exclusion nucléaire de suppresseurs de tumeurs par CRM1 pourrait permettre la chimiorésistance et qu'un inhibiteur de ce processus, la leptomycine B, sensibiliserait les cellules cancéreuses à l'action de certains agents cytotoxiques.

Pour ce faire, nous avons utilisé des lignées cellulaires ovariennes et endométriales et les avons traitées avec la leptomycine B(LMB), le cisplatine ou le TRAIL, soit de façon singulière ou en combinaison. Nous avons par la suite évalué la capacité de ces traitements à induire l'apoptose, ce qui a été mesuré via la quantification du clivage des caspases, de PARP et par cytométrie en flux. La technique d'immunofluorescence a été utilisée afin de déterminer la localisation intracellulaire de p53 lors de ces expériences. Afin de mesurer plus tangiblement l'efficacité de nos thérapies, nous avons procédé à des essais de formation de colonies. Finalement, des qRT-PCR ont été fait dans le but d'établir les changements d'expression de divers régulateurs de l'apoptose lors de nos traitements.

Nos résultats suggèrent que la combinaison de LMB et de TRAIL permet l'induction robuste de l'apoptose dans toutes les lignées cellulaires étudiées. De plus, cette sensibilisation apparaît comme synergique et ne semble pas dépendre de p53; c'est plutôt l'augmentation de plusieurs protéines pro-apoptotiques en convergence de la diminution des niveaux de plusieurs protéines anti-apoptotiques qui permet l'effet synergique observé. En somme, nos résultats suggèrent que l'utilisation de thérapie combinées, ciblant à la fois le transport nucléaire et l'induction de la mort cellulaire par la voie extrinsèque de l'apoptose, pourrait venir s'ajouter à l'arsenal thérapeutique utilisé pour traiter les cancers gynécologiques.

4.3 Article complet (anglais) : Inhibition of CRM1 activity sensitizes endometrial and ovarian cell lines to TRAIL-induced cell death

Abstract

Background: CRM1 enrichment has been shown to be indicative of invasive as well as chemoresistant tumors. On the other hand, TRAIL, a powerful and specific anti-tumoral agent, has yet to be used effectively to treat gynecological tumors in patients. In the present study, we examined if CRM1, a nuclear exporter capable of mediating protein transport, could be a relevant target to restore chemosensitivity in chemoresistant cells. We thus explored the hypothesis that CRM1-driven nuclear exclusion of tumor suppressors could lead to chemoresistance and that CRM1 inhibitors could present a novel therapeutic approach, allowing sensitization to chemotherapeutic agents.

Methods: Ovarian cancer cell lines, as well as endometrial cancer cell lines, were treated with leptomycin B (LMB), cisplatin and TRAIL, either singly or in combination, in order to induce apoptosis. Western blot and flow cytometry analysis were used to quantify caspases activation and apoptosis induction. Immunofluorescence was used to determine nuclear localization of p53. Colony formation assays were performed to determine therapeutic effectiveness; p53 siRNA were used to establish p53 role in sensitization. Additional information from GEO database and Prognoscan allowed us to contextualise the obtained results. Finally, qRT-PCR was performed to measure apoptotic regulators expression.

Results: TRAIL and LMB combination therapy lead to cleavage of caspase-3 as well as the appearance of cleaved-PARP, and thus, apoptosis. Further experiments suggested that sensitization was achieved through the synergistic downregulation of multiple inhibitor of apoptosis, as well as the activation of apoptotic pathways. p53 was enriched in the nucleus following LMB treatments, but did not seem to be required for sensitization; additional experiments suggested that p53 opposed the apoptotic effects of LMB and TRAIL. Results obtained from public data repositories suggested that CRM1

was a driver of chemoresistance and poor prognostic; DR5, on the other hand, acted as as a marker of positive prognostic.

Conclusions: Taken together, our results suggest that the use of CRM1 inhibitors, in combination to chemotherapeutic compounds, could be highly effective in the treatment of gynecological malignancies.

Introduction

The vast majority of tumors found in human cancer can be fought through the use of chemotherapeutic drugs. However, chemoresistance is a major hurdle in the treatment of cancer, especially in the case of ovarian and endometrial cancers [1, 2]. The strikingly high mortality rate observed in ovarian cancer, as well as relapsing endometrial cancer, can be explained by the onset of this type of resistance, which renders our usual drugs regimens ineffective. It is therefore crucial that we develop novel strategies to overcome chemoresistance and reinstate the effectiveness of various chemotherapeutic agents. The ability, or lack thereof, of cells to respond to chemotherapeutic agents is widely thought to be correlated to their readiness to enter the apoptotic program; this program, governed by a wide variety of both pro-survival and pro-apoptotic proteins, is largely dysregulated in tumor cells, through either mutations or functional silencing. Oncogenic mutations, either providing gain-of-function to proto-oncogenes or loss of function to tumor suppressors, are difficult to drug efficiently; the nature of the mutations often confer independence from upstream signaling or become incapable of downstream signaling. Alternatively, mislocalization of key proteins can alter their specific activity, either through substrate availability, or lack thereof, as well as turnover modulation. In this paper, we will clarify the relationship between CRM1, an ubiquitous and fundamental actor of the nuclear export machinery, and chemoresistance of gynecological malignancies. We will present results that support for the first time the effectiveness of nuclear export inhibitors in the treatment of gynecological cancers through the reinstatement of TRAIL-induced apoptosis sensitivity. Finally, we will underline the paradoxical effect of p53 localization and expression on these sensitization mechanisms.

Chromosomal maintenance 1 (CRM1) is part of a conserved superfamily of RanGTP-binding transporters that regulates and facilitates nuclear pore passage of RNAs, proteins and RNPs from the nucleus to the cytoplasm compartment [3]. CRM1 binds to leucine-rich motifs known as nuclear export signals (NES) that are present on its cargoes; CRM1 interacts with its target and then readily transports it out of the nuclear compartment. The presence of a NES on the target protein is critical for its binding and interaction with CRM1 [4]. CRM1 interaction with NES-bearing proteins is inhibited by the action of leptomycin B (LMB), a potent antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* that displays powerful antitumor abilities, especially in the context of drug resistant cancers. This drug induces apoptosis through the inhibition of several tumor suppressors' export-driven nuclear exclusion, thereby potentiating their action in the nucleus [1, 5-7]. p53 is a well-known tumor suppressor, considered as one of the most pivotal regulator of cell fate; interestingly, p53 localization is highly dependent on CRM1 driven export [8]. The p53 tumor suppressor is one of the most widely mutated protein in ovarian cancer, with more than 94% of high grade serous ovarian carcinomas presenting a mutated p53, 62% of which are missense mutations [9]. Serous endometrial carcinomas, part of the type 2 endometrial tumor type family, also presents a p53 mutation rate as high as 90% [10]. Multiple studies have demonstrated the potent ability of LMB to induce apoptosis in otherwise resistant cancer cells, either alone or in combination with chemotherapy, mainly through p53 stabilisation and subsequent activation [6, 11-13]. While p53 mutations generally bestows resistance to multiple type of chemotherapeutic approaches, LMB effect on apoptosis induction remains poorly understood in gynecological tumors, especially in the ovarian tumorological context presenting almost universal p53 mutations. In all cases, apoptosis can be triggered through the intrinsic or extrinsic pathway. While the former is dependant upon DNA damage, the latter involves membrane-bound receptors activated by various ligands. Many receptors and ligands have been characterized to date, namely Fas-ligand, which uses the Fas receptor (FasR), TNF α , which uses TNF-receptor 1 (TNFR1) and TRAIL, which uses Death receptor-4 and 5 (DR4-5); all of these receptors are members of the tumor necrosis factor receptors family. They all possess an intracytoplasmic domain called the "death domain" which can, upon ligand binding, recruit intracellular adapter proteins such as FADD, which will in turn

recruit procaspase-8. This adapter complex, aptly named death-inducing signaling complex (DISC), will then activate downstream caspases and initiate the execution phase of apoptosis. [14, 15]. This convergent finality of both the intrinsic and extrinsic death pathways is characterized by the cleavage and activation of caspase-3, -6 and -7; however, caspase-3 is widely considered as the penultimate executioner of the apoptotic program. While gynecological malignancies will often develop cisplatin resistance at later stages [16], most of them are almost completely resistant to TRAIL-induced apoptosis, partly owing to abnormal FLIP expression [17-20]. Many proteins also oppose the TRAIL-induced apoptotic process, such as XIAP, which inhibits signal transduction as well as caspases activation and MCL-1, which counteracts the ability of Bcl-2 family proteins to induce cytochrome C release [14, 15]. While early clinical trials hinted at TRAIL potential as a novel, tumor-specific therapy, this enthusiasm was impeded by the increasingly clear inability of TRAIL single therapy to reliably induce therapeutic response [17]. Par-4, a tumor suppressor first discovered in apoptotic prostatic cancer cells [21] and ubiquitously expressed throughout the body, is responsible for apoptosis induction in multiple cell types [22-27]. Undoubtedly, Par-4 most interesting ability resides in its capacity to induce death selectively in tumor cells, sparing normal cells from cellular suicide, in a manner reminiscent of TRAIL specificity [10, 11]. We have also recently reported that Par-4 is cleaved by caspase-3 at EEPD(131)↓G, generating a 25 kDa fragment (cleaved-Par-4) that is capable of inducing apoptosis and that this cleavage was inhibited by XIAP activity [26, 28]. In this research we have studied the effect of LMB on chemosensitization of gynecological cancers as well as the role of CRM1 in this process. We have also assessed the effectiveness of combination therapy of LMB and chemotherapeutic drugs that induce enhanced cell death in chemoresistant cancer cell lines as well as the role of p53 localization in this mechanism. Finally, we demonstrated the ability of LMB to reliably and powerfully sensitize multiple cell types, presenting both mutated and wild-type p53, to TRAIL-induced apoptosis in a p53-independent manner.

Material and methods

Cell lines and reagents

KLE, OVCAR-3 and SKOV-3 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). HIESC cells were graciously offered by Michel A. Fortier (Université Laval, Québec, Canada). A2780 and A2780CP were kindly provided by Dr. G. Peter Raaphorst (Ottawa regional cancer center, Ottawa, Canada). Ishikawa cells were kindly provided by Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Montréal, Canada). ECC-1 cells were kindly provided by Nicolas Gévry (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada). The chosen cell lines allow us to mimic multiple characteristics of gynecological cancers by recapitulating main mutations and molecular hallmarks found in patients. Ishikawa are a well differentiated, ER-positive cell line derived from a low-grade adenocarcinoma; Ishikawa are PTEN-null and express mutated p53 [29-31]. ECC-1 are a well differentiated, ER-positive cell line derived from a low-grade adenocarcinoma; ECC-1 are PTEN-null and presents no p53 mutations [32-35]. KLE are a poorly differentiated, ER-negative cell line derived from high-grade adenocarcinoma; KLE express wild-type PTEN and mutated p53 [36-38]. A2780 are a poorly differentiated, ER-negative cell line derived from high-grade ovarian adenocarcinoma; A2780 express mutated PTEN and wild-type p53 [39-41]; A2780CP are very similar, having been generated from the former cell line, but express mutated p53 [39, 42]. OVCAR-3 are a poorly differentiated, ER-positive cell line derived from a high-grade ovarian adenocarcinoma; OVCAR-3 express wild-type PTEN and mutated p53 [39, 41, 43]. Finally, SKOV-3 are a poorly differentiated, ER-positive cell line derived from high-grade ovarian adenocarcinoma; SKOV-3 express wild-type PTEN and are p53-null [41, 44]. All the antibodies, as well as leptomycin B, were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) except for the anti-rabbit secondary antibody used for western blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and for the Alexa Fluor 488 tagged anti-rabbit secondary antibody, which was obtained from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Recombinant TRAIL, Annexin V/PI used for flow cytometry experiments and siRNAs were procured from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). X-2 transfecting agent was procured

from Mirus (Madison, WI, USA). Cisplatin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Flow cytometry

FITC annexin V/dead cell apoptosis kit was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the treated cells were collected, washed with PBS, and then diluted in $1\times$ annexin binding buffer (100 μ L). For each sample, 5 μ L of annexin V and 1 μ L of propidium iodide were added to the cell suspension and then incubated 15 minutes at room temperature. After incubation time, an additional 100 μ L of the annexin binding buffer was added to each sample for a total of 200 μ L. Samples were analyzed (6000–10 000 events) using a Beckman Coulter flow cytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canada).

MTT assays

Briefly, plates were seeded with 180 μ L of normal and cancer cells in suspension (for HIESC, 14 000; Ishikawa, 16 000; ECC-1, 14 000; A2780/CP, 16 000; OVCAR-3, 16 000) in medium using 96-wells plates. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24h. TRAIL, cisplatin and leptomycin B were diluted in fresh medium, serially diluted and added to the plates to obtain the final indicated concentration. Cell were then incubated for another 24h after which 10 μ L of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5mg/mL in PBS) were added to the wells. Four hours later, 100 μ L of the solubilization solution (10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0,01 M HCl) were added and the plates incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The optical density was read using a FluoStar Optima BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA) at 565nm. Each experiments were performed in duplicate on the same plate.

Western blot analysis

After the end of the treatment period or transfection time, both floating and attached cells were collected and cell lysate was done using cold radioimmunoprecipitation assay lysis buffer containing protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), followed by three freeze–thaw cycles. Proteins were measured using the Bio-Rad DC protein assay. Western blotting was performed following a classical protocol. Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies were used, and the blot was developed using SuperSignal West Femto substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), as described by the manufacturer, using a cooled CCD camera (UVP System). The shown results are representative of at least three independent experiments.

Colony formation assays

Cells were plated at a confluence of 2000 cells per well in a 6 wells plate and grown for 24 h. Cells were then treated for 24h after which the media was replaced. Cells were allowed to grow for ten days and media was replaced every 5 days. After 10 days, cells were washed with PBS and fixed in ice-cold formalin for 10 min. After fixation, colonies were colored with Giemsa Stain 0.4% for 5 min. Plates were then washed with running water, allowed to dry and colonies were photographed using a cooled CCD camera. Images were quantified using the ColonyArea software [45].

RT-qPCR

To measure the transcripts levels, total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini Kit from QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). Total RNA (1µg) was subjected to reverse transcription using qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) as described by the manufacturer's instructions. The reverse-transcribed RNA was then amplified by PCR using specific primers. The expression of DR4, DR5, DcR1, DcR2, PUMA, p21 and p27 were measured through the use of specific primers detailed in Table 1. Each reaction mixture (final volume, 25 µL) were performed using Perfecta SYBR Green Supermix Low Rox (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) according to

manufacturer protocol and quantified using a Mx3000P system (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada). For each gene target, a standard curve was generated to determine the efficiency of the reaction, and the Pfaffl analysis method was used to measure the relative quantity of gene expression. Each real time PCR was performed in duplicates and results were drawn from at least three independent experiments. 18S was used as a reference gene based on its stable expression in all cells and between all treatments. The Pfaffl method of quantification was used to measure relative expression.

siRNA and transfections

For silencing of p53 expression, cells were seeded in 6-well plates ($\sim 6 \times 10^5$ cells per well) and reversed transfected with 50 nM of p53 siRNA (5'-GGAUUUCAUCUCUUGUAUAtt -3) or control scrambled siRNA. In order to perform the reverse transfection, we used the Mirus X-2 transfection reagent in accordance with the manufacturer's instructions. Following reverse transfection, cells were grown for 24h and the media was then replaced; treatments and subsequent analyses were then performed as described before.

Immunofluorescence

Cells were treated as described above and were grown in 6-well plates containing sterile coverslips. On the day of analysis, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized for 10 min using 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate at room temperature. After blocking with 4% normal goat serum blocking for 1 h, cells were incubated with primary antibody at a concentration of 1 μ g/mL or isotypic control antibody for 1 h. After incubation with primary antibody, cells on the coverslips were washed three times with PBS and then incubated with Alexa Fluor 488 secondary antibodies (1:800 dilution) for 30 min at room temperature in dark conditions. Cells were counterstained with Hoechst 33248 (0.25 μ g/ml) for 5 min, and slides were mounted using Slowfade gold antifading reagent (Invitrogen) and viewed under a Leica TCS SP8 confocal microscope, using a 63x immersion lens (Leica Microsystems, Concord, Ontario, Canada).

Statistical analyses

Statistical analysis was done by one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test or Student's t-test where appropriate. Combination therapy data were subjected to 2-way ANOVA. Interaction rating emanating from the 2-way ANOVA was used to determine synergism between studied drugs [46, 47]. Generally, the interaction quantified in a 2-way ANOVA can be compared to a null hypothesis test (no direct interaction, which is a fundamentally similar effect to additivity, and thus, absence of synergism). From this premise, highly significant interaction between drugs effect on cell death suggest form of synergism. When 2-way ANOVA failed to show synergistic effect, differences between experimental groups were determined by t-test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. All analysis was performed using GraphPad PRISM software, version 3.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Leptomycin B combination therapy significantly reduces cell viability in a tumor specific manner.

In order to determine the effect of LMB combination therapy with either cisplatin or TRAIL, we conducted cell viability experiments using the MTT assay. Cells were treated either with a single agent, cisplatin or TRAIL, or with a combination of either agent with LMB (Fig. 4.1A). Our results confirmed the previously obtained data, demonstrating that LMB significantly sensitized A2780CP cells to the cytotoxic effects of cisplatin; however, high concentrations of cisplatin alone showed the ability to reduce cell viability in most cell lines. Strikingly, TRAIL, even at high concentration, proved ineffective in reducing cell viability in almost all cell lines. However, again in agreement with previously obtained results, a significant sensitization effect was observed in the case of LMB concomitant treatment with TRAIL, confirming LMB ability to enhance TRAIL inhibitory effect on cell viability. When compared together, we also observed that the combined treatment, both in the case of LMB and cisplatin as well as LMB and TRAIL, seemed to have an almost imperceptible effect on human immortalized endometrial stromal cells (HIESC); considering that HIESC cells are transformed, non-malignant

cells, this result suggest that the combination of LMB with chemotherapeutic agents could potentially exert a selective cytotoxicity, further increasing its potential therapeutic value (Fig. 4.1B). In order to explore the clinical implications of CRM1 expression in ovarian cancer progression and contextualise our results, we used PrognosScan [48], an online tool capable of correlating patients prognosis with gene expression by systematically mining public databases. Using this tool, we determined the role of CRM1 expression on overall survival of ovarian cancer patients. The results obtained from the dataset [49] showed that patient with high expression of CRM1 had a worst overall survival time when compared to low expressing ones (n=278, HR: 1.40, Cox p-value:0.046668) (Fig. 4.1C). A second data set, obtained from GEO database, compared three ovarian cancer patients presenting carboplatin sensitivity with three resistant patients. The results found in this dataset show a clear and significant correlation ($p<0.001$) between relative CRM1 mRNA expression and carboplatin resistance, strongly supporting the idea that CRM1 could act as a driver of chemoresistance (Fig. 4.1D). Taken together, the obtained results suggest that CRM1 could be a potential driver of chemoresistance and that drugs inhibiting its action, such as LMB, could act as potential therapeutic target for ovarian cancer combination therapy.

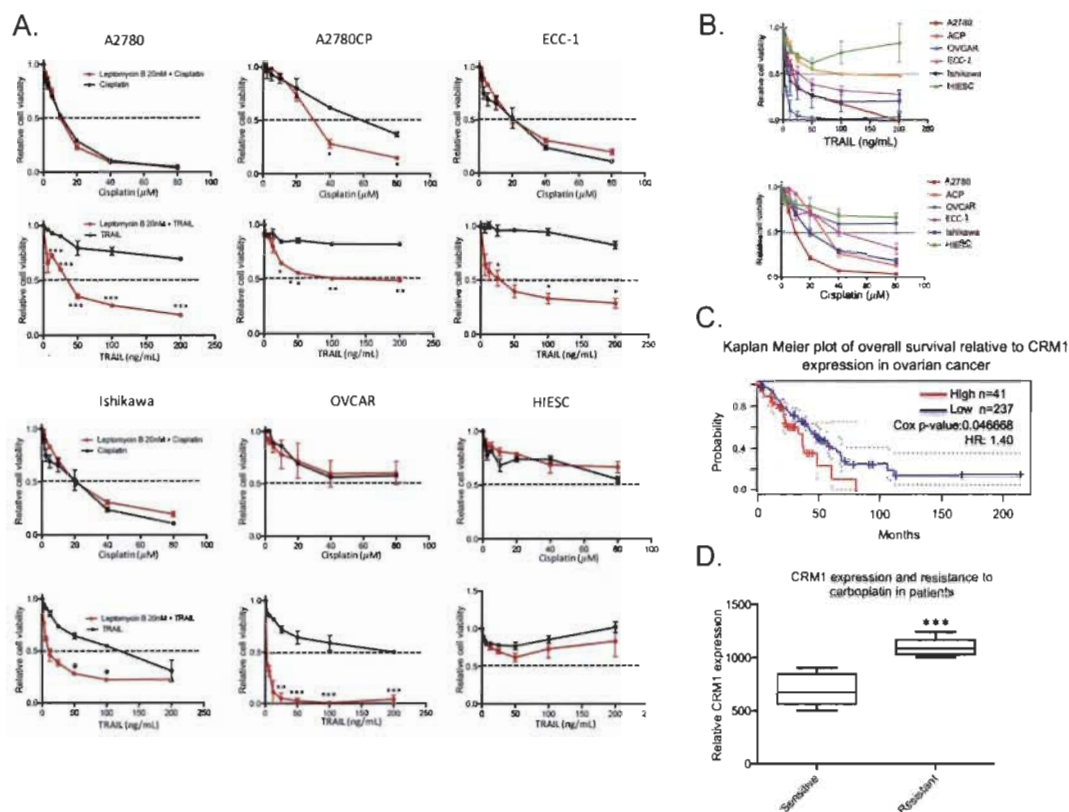


Figure 4.1

Leptomycin B combination therapy significantly reduces cell viability in a tumor specific manner.

A. Studied cell lines were treated with increasing concentration of cisplatin (0-80 μ M) and TRAIL (0-200ng/mL) in presence or absence of leptomycin B (20nM) for 24h. The MTT was then used to determine the resultant changes in cell viability. Results shown are representative of three independent experiments. B. Comparison between the combined therapy results of every cell line for both chemotherapeutic agents. C. Kaplan Meier plot showing the significantly increased survival rate found in ovarian cancer patients presenting low level of CRM1 expression; obtained from dataset GSE9891/235927_at D. Box plot illustrating the significantly increased CRM1 expression in the context of carboplatin-resistant patient ovarian tumor samples; obtained from dataset GDS1381/37729_at. Except for C, in which n number is indicated specifically, all data are means \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Combination of cisplatin or TRAIL with leptomycin B synergistically induces apoptosis induction in endometrial cancer cell lines

The previously obtained data suggested a key role for CRM1 in the chemoresistance gynecological tumors; we thus decided to screen endometrial cancer cell lines in an effort to better our understanding of these intrinsically resistant tumors [2]. We used either LMB (20nM), cisplatin (10 μ M), TRAIL (100ng/mL) or a combination of LMB with cisplatin or TRAIL. The dosage used was determined according to concentrations used in our previous publications [50-52] as well as recent literature [6, 53, 54]. Results show that the use of any single agent failed to induce caspase-3 cleavage, with the exception of LMB in Ishikawa cells. However, combination of cisplatin and LMB treatment was successful in inducing caspase-3 cleavage in the observed cell lines, especially in the case of Ishikawa cell line where the 21kDa as well as 17-12kDa cleavage products can be observed in the LMB and cisplatin combined treatment. Similarly, combination of TRAIL with LMB induces the emergence of a 21kDa caspase-3 precursor fragment as well as fully activated 12-17kDa cleavage products in endometrial cell lines ECC-1 and Ishikawa; KLE cells did not display cleaved caspase-3 (Fig. 4.2A). These results indicate that combination therapy allows enhanced caspase-3 activation and suggest the subsequent induction of apoptosis. We then quantified the cleavage of PARP, a protein targeted by caspase-3 during apoptosis induction. Every examined cell line showed minute amount of PARP cleavage in response to cisplatin-only treatment. The use of LMB, however, increased PARP cleavage in both ECC-1 and Ishikawa cell lines in response to cisplatin. Similarly, TRAIL-only treatments failed to induce PARP cleavage in all the tested cell lines. The use of LMB, however, sensitized all three cell lines to TRAIL. Densitometric quantification coupled with two-way ANOVA statistical analysis revealed that the increase of PARP cleavage resulting from the combination of either LMB and cisplatin (ECC-1 and Ishikawa) or LMB and TRAIL (ECC-1, Ishikawa and KLE) was synergistic (Fig. 4.2B). Further analysis using annexin V/PI flow cytometry assays show similar results (Fig. 4.2C); however, only the combined use of LMB and cisplatin (Ishikawa) as well as LMB and TRAIL (ECC-1) displayed synergistic effects. These results suggest that the combined use of LMB sensitizes, in a significantly synergistic fashion, endometrial cell lines to TRAIL induced cleavage of PARP and subsequent induction of apoptosis.

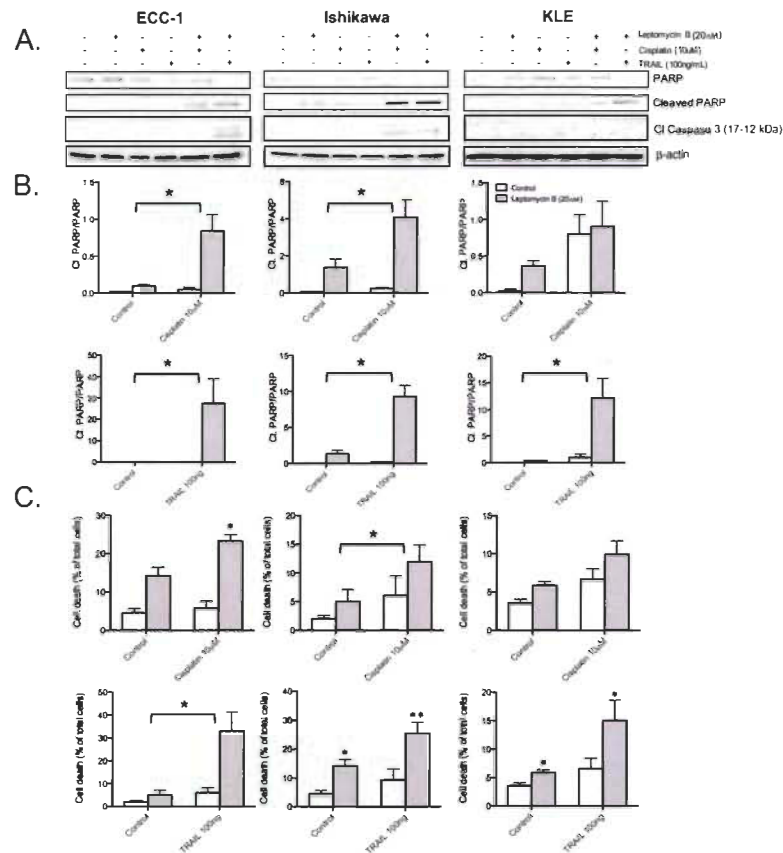


Figure 4.2

Combination of cisplatin or TRAIL with leptomycin B synergistically induces apoptosis induction in endometrial cancer cell lines.

A. Endometrial cancer cell lines were treated with leptomycin B (20nM), cisplatin (10μM), TRAIL (100ng/mL) or a combination of leptomycin B with cisplatin or TRAIL for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. B. Densitometric analysis of PARP cleavage followed by 2-way ANOVA analysis; bracket indicate when interaction was statistically significant. C. Flow cytometry analysis was performed on the cells by staining with annexin V/PI and the levels of cell death was measured; cells stained with annexin V and/or PI were used to determine the relative quantification of cell death. 2-way ANOVA was performed on the data; brackets indicate when interaction was statistically significant. All data are means ± SEM of three independent experiments. *, p<0.05; **, p<0.01.

Combination of cisplatin or TRAIL with leptomycin B synergistically induces apoptosis induction in ovarian cell lines

We repeated the previous experiments in order establish whether the effects observed in endometrial cell lines could be duplicated in ovarian cell lines. It is well known that inherent resistance to TRAIL-induced apoptosis arises in multiple ovarian carcinoma cell lines, through still poorly described mechanisms [17, 18]; we thus hypothesized that LMB combination therapy could alleviate this therapeutic hurdle, as we previously demonstrated in endometrial cell lines. In order to study the effect of LMB combination treatments on the induction of apoptosis in ovarian cancer, we used cell lines SKOV-3 and OVCAR-3, both models being extensively used in the literature. We also included A2780 and A2780CP cell lines in the study considering their fundamental homology; A2780CP was produced from A2780 through successive passages in presence of constant sub-lethal concentration of cisplatin, which mimics the stochastic model of clonal selection and tumor evolution observed in ovarian cancer chemotherapeutic resistance acquisition.

We treated all cell lines with aforementioned drug regimens and then quantified caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 4.3A). OVCAR-3 cells showed some measure of sensitivity to every single agent treatments as suggested by the cleavage of PARP; however, neither OVCAR-3 nor SKOV-3 displayed increased sensitivity to combined LMB and cisplatin treatment. The combination of cisplatin or TRAIL with LMB induced caspase-3 cleavage products observable at 21kDa as well as 17-12kDa in SKOV-3 cells; OVCAR-3 cells, on the other hand, showed such cleavage in the case of cisplatin single therapy. In accordance to their cisplatin-sensitive phenotype, cisplatin single agent therapy generated caspase-3 cleavage products observable at 21kDa as well as 17-12kDa in A2780 cells; however this effect was not observable in the case of TRAIL single-agent treatment. A2780CP cells, being robustly cisplatin resistant, showed no such caspase cleavage in the case of cisplatin single therapy; the use of LMB restored the ability of both chemotherapeutic agents to induce caspase-3 cleavage. In all cases, TRAIL single agent treatment failed to induce caspase-3 cleavage, an effect that was ubiquitously reversed upon combination with LMB. Densitometric quantification coupled with two-way

ANOVA statistical analysis revealed that the increase of PARP cleavage resulting from the combination of LMB and TRAIL was synergistic in all cell lines (Fig. 4.3B); the combination of cisplatin and LMB showed no such synergistic effect, except in the case of A2780CP. Flow cytometry assays using AnnexinV/PI confirmed these results and as well as the synergistic nature of LMB and TRAIL combination treatment efficiency in inducing apoptosis (Fig. 4.3C). Taken together, these results strongly indicate the capacity of LMB to synergistically act with TRAIL to induce cell death through apoptosis in ovarian cell lines, as well as reversing the acquired resistance to cisplatin exhibited by A2780CP cells.

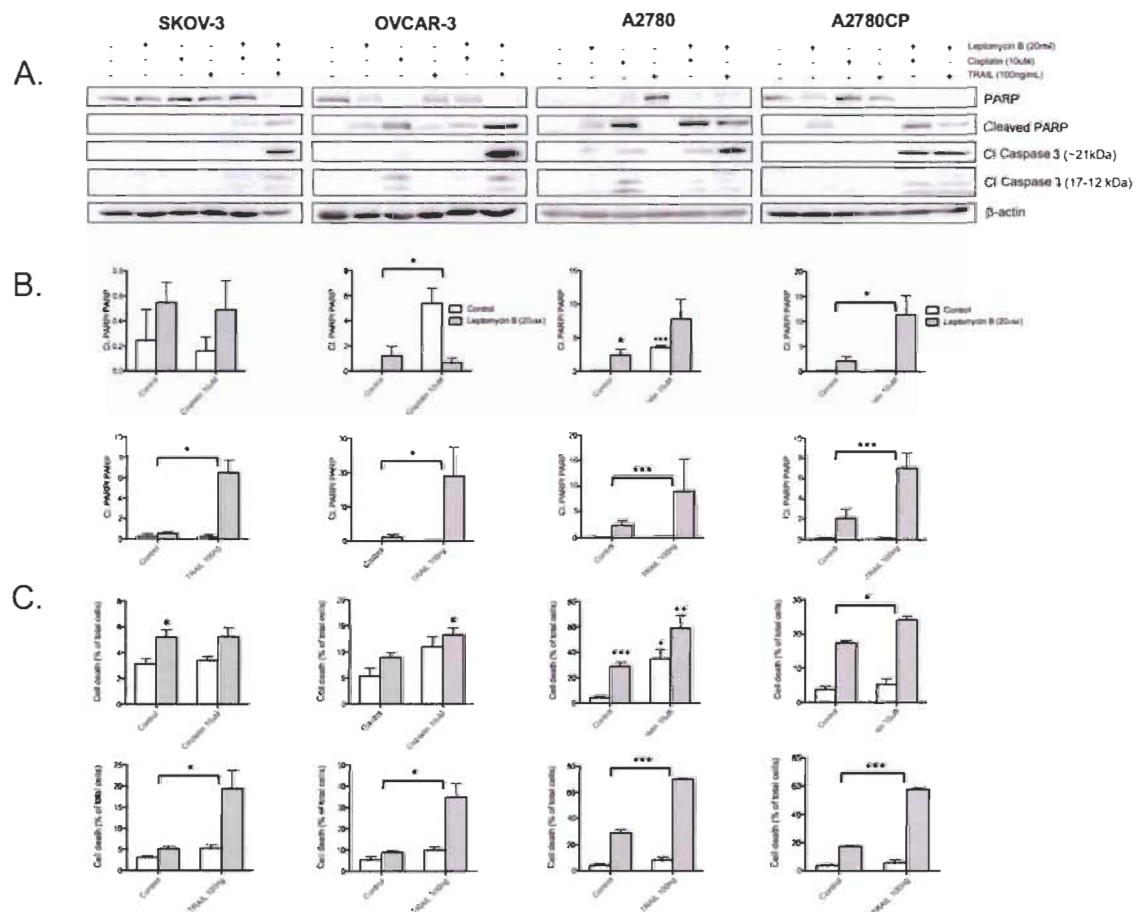


Figure 4.3 Combination of cisplatin or TRAIL with leptomycin B synergistically induces apoptosis induction in ovarian cell lines.

A. Ovarian cancer cell lines were treated with leptomycin B (20nM), cisplatin (10μM), TRAIL (100ng/mL) or a combination of leptomycin B with cisplatin or TRAIL for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. Results

shown are representative of three independent experiments. B. Densitometric analysis of PARP cleavage followed by 2-way ANOVA analysis; bracket indicate when interaction was statistically significant. C. Flow cytometry analysis was performed on the cells by staining with annexin V/PI and the levels of cell death was measured; cells stained with annexin V and/or PI were used to determine the relative quantification of cell death. 2-way ANOVA was performed on the data; brackets indicate when interaction was statistically significant. All data are means \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Combination of TRAIL and leptomycin B synergistically induces extrinsic and intrinsic apoptotic programs in a p53-independent manner.

Considering the previously obtained results, we endeavored to shed some light on the molecular mechanisms responsible for cells sensitization to TRAIL by LMB. We decided to conduct all subsequent experiments using the A2780CP ovarian cancer cell line as well as the ECC-1 endometrial cancer cell lines as they, respectively, are highly relevant models to both classical manifestation of these cancers; A2780CP is an epithelial, hormone independent, robustly cisplatin-resistant cell line presenting p53 mutations; on the other hand, ECC-1 is an epithelial, hormone responsive, mildly cisplatin-resistant cell line presenting PI3K/Akt amplifications and PTEN deletion. We first measured by Western Blot the protein level of multiple regulators of apoptosis in response to single agent treatments as well as combined treatments. We thus treated the cells with either LMB (20nM), cisplatin (10 μ M), TRAIL (100ng/mL) or a combination of LMB with cisplatin or TRAIL. Results showed that in both studied cell lines, the combination of LMB and TRAIL allowed Bid cleavage, an upregulation in DR5 expression as well as p53, downregulation of c-FLIP and the full cleavage of caspase-8 (Fig. 4.4A). The densitometric analysis of these results can be found in Supplementary Figure 1. Further experiments involving solely LMB and TRAIL allowed us to more thoroughly characterize the modulation of key regulators of apoptotic dynamics. Firstly, in both cell lines, only the combination of LMB and TRAIL allowed the appearance of cleaved Par-4. This was accompanied by an abrogation of XIAP expression in A2780CP; alternatively, we observed a reversal of XIAP expression induced by TRAIL in ECC-1 when using a combination of LMB and TRAIL. Finally, the combination of LMB and TRAIL also increased Bax protein levels in ECC-1; this was not observable in A2780CP cells. Finally,

LMB was found to downregulate MCL-1 protein levels in A2780CP when used singly as well as in combination TRAIL; this was not the case in ECC-1 cells (Fig. 4.4B). Considering that one of LMB most well-known mechanism of action is through the inhibition of tumor suppressors nuclear export, we also investigated the subcellular localization of p53 following the aforementioned treatments. Our results showed that the combination of LMB and TRAIL promoted robust localization of p53 to the cell nucleus (Fig. 4.4C). These observations suggested that p53 might be partly responsible for the sensitization effect of the combined treatments, as was hinted in multiple other publications. However, considering that TRAIL canonically induces death in a p53-independent manner and that ovarian cancer, as well as recurrent endometrial cancer, presents extensive p53 mutation profiles, we examined the effect of p53 knockdown on the induction of apoptosis in the context of LMB and TRAIL combined treatments (Fig. 4.4D). A2780CP cells and ECC-1 cells were reversed transfected with p53 siRNA and were subjected to a combined treatment of LMB (20nM) and TRAIL (100ng/mL). Indeed, the obtained results showed that p53 knockdown resulted in a significant increase in PARP cleavage in both cell lines. However, while A2780CP cells showed a slight increase in cleaved caspase-3, ECC-1 showed a drastic decrease in the processed form of the protease. Finally, we investigated the clinical relevance of elevated LMB-induced DR5 expression through Prognoscan dataming. Our results showed that high expression of DR5 (TNFRSF10B) was significantly associated with improved overall survival in patients with ovarian cancer (n=278, HR: 0.65, Cox p-value: 0.027138) (Fig. 4.4E). Altogether, our results suggest that the combination of LMB and TRAIL allows for the upregulation of crucial inducer of apoptosis, Bid cleavage and downregulation of antiapoptotic proteins; interestingly, our results suggest that p53 is not required and seemingly opposes the occurrence of these events.

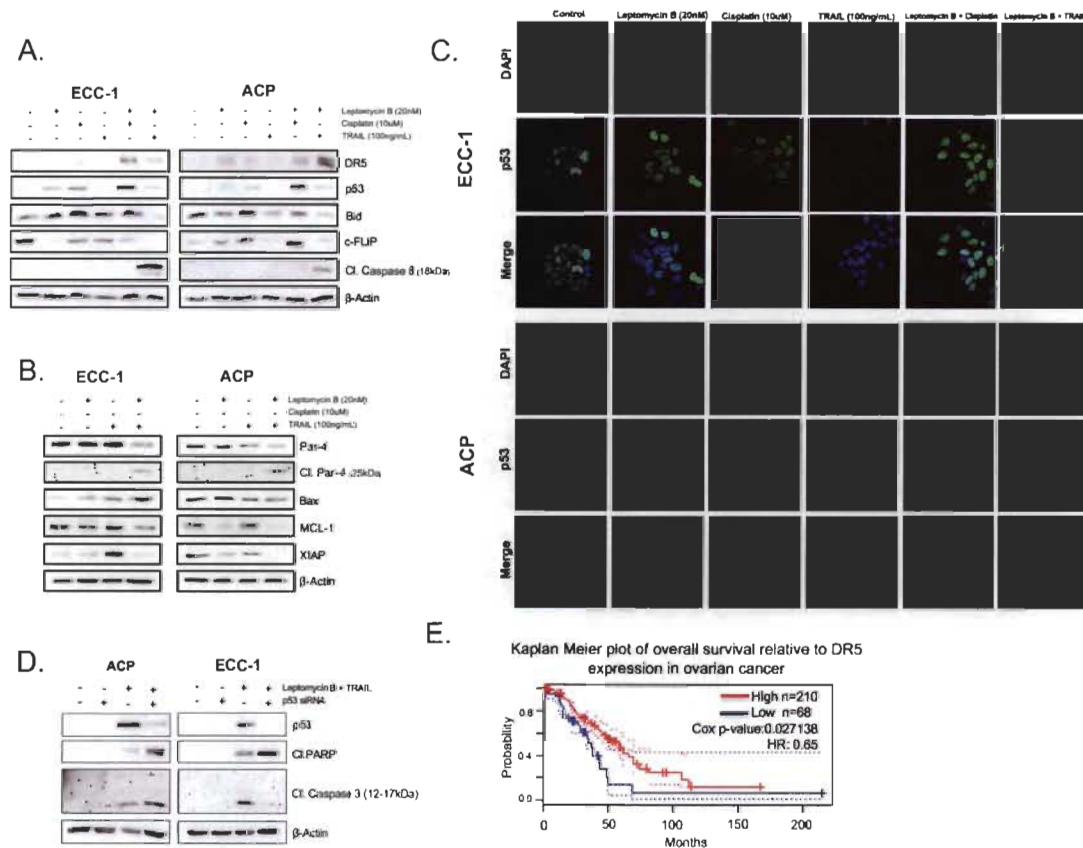


Figure 4.4 Combination of TRAIL and leptomycin B synergistically induces extrinsic and intrinsic apoptotic programs in a p53-independent manner.

A. ECC-1 and A2780CP cell lines were treated with leptomycin B (20nM), cisplatin (10μM), TRAIL (100ng/mL) or a combination of leptomycin B with cisplatin or TRAIL for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. B. ECC-1 and A2780CP cell lines were treated with leptomycin B (20nM), TRAIL (100ng/mL) or a combination of leptomycin B with TRAIL for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. C. Immunofluorescence experiments were conducted in order to determine the effect of the previous treatments on p53 subcellular localization D. ECC-1 and A2780CP cell lines were reverse transfected with a p53 siRNA and then treated a combination of leptomycin B (20nM) and TRAIL (100ng/mL) for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. E. Kaplan Meier plot showing the significantly increased survival rate found in ovarian cancer patients presenting high level of DR5 receptors; obtained from dataset GSE9891/209294_x_at.

Combination of TRAIL and leptomycin B significantly reduces tumor cells ability to clonally proliferate in a p53 independent manner.

In order to inquire the long-term effect of the previously demonstrated synergism between LMB and TRAIL on cell viability and induction of apoptosis, we performed clonogenic assays. This measure presents a high clinical value, considering the biological context of tumor progression. Additionally, performing a clonogenic assay allowed us to more closely mimic the longstanding effect of a single combined, lower concentration treatment on a cellular population in order to simulate more powerfully a possible future therapeutic context. Preliminary experiments suggested that LMB, used singly possessed an IC₅₀ of ~4nM in A2780CP and ECC-1 cell lines (data not shown). Considering that the cells were subjected to the treatment for 24 hours and then allowed to grow for 10 days in the absence of LMB, this result suggests that LMB, even at low concentration, strongly reduce cell viability. Building on these results, we decided to use a concentration of 2nM for the following experiments; in both cell lines, this concentration showed to have almost no effect on cell proliferation, thus enabling us to truly observe the sensitizing effect of LMB even at minimal concentrations. Cells were subjected to increasing concentrations of TRAIL, either in the presence or absence of leptomycin (2nM). Using the ColonyArea plugin [45], we measured the pixel intensity of the obtained colonies and quantified the results (Fig. 4.5A). Our results showed a significant sensitization of both A2780CP and ECC-1 cells to very low concentrations of TRAIL. In the case of ECC-1, the LMB treatment allowed a significant decrease in cell proliferation potential at a concentration of as low as 10ng/mL of TRAIL; a similar effect was observed in A2780CP cells, with a significant decrease in cell proliferation potential found at 40ng/mL of TRAIL and higher. It is interesting to note that without LMB, TRAIL seemed to bolster proliferation in A2780CP cells, possibly through a positive feedback loop gained by the selection of resistant cells by the single agent treatment. Together, these results clearly demonstrate the ability of LMB to strongly sensitize cells to the proliferative inhibition effect of TRAIL (Fig. 4.5B). We also investigated the role of p53 in this process; considering that LMB effect is widely considered to be dependent upon p53 nuclear accumulation, it was, in our opinion, crucial to demonstrate the impact of p53 depletion on the observed sensitization effect. We performed experiments using identical concentrations as described above;

however, upon plating, cells were reversed transfected using either p53 siRNA or scrambled siRNA as control. Cells were then treated with 2nM of LMB as well as increasing concentrations of TRAIL. In accordance with our previously obtained data, the gathered results showed that p53 depletion significantly sensitized A2780CP cells to a concentration of 10ng/mL of TRAIL and higher. On the other hand, p53 depletion showed almost no effect on ECC-1 cells, but showed a significant sensitization effect at 80ng/mL of TRAIL (Fig. 4.5C). These results suggested that LMB was capable of sensitizing cells to the anti-proliferative effects of TRAIL. Interestingly, p53 appeared to oppose this sensitization mechanism, both in the context of a cell line presenting mutated p53 (A2780CP) as well as wild-type p53 (ECC-1).

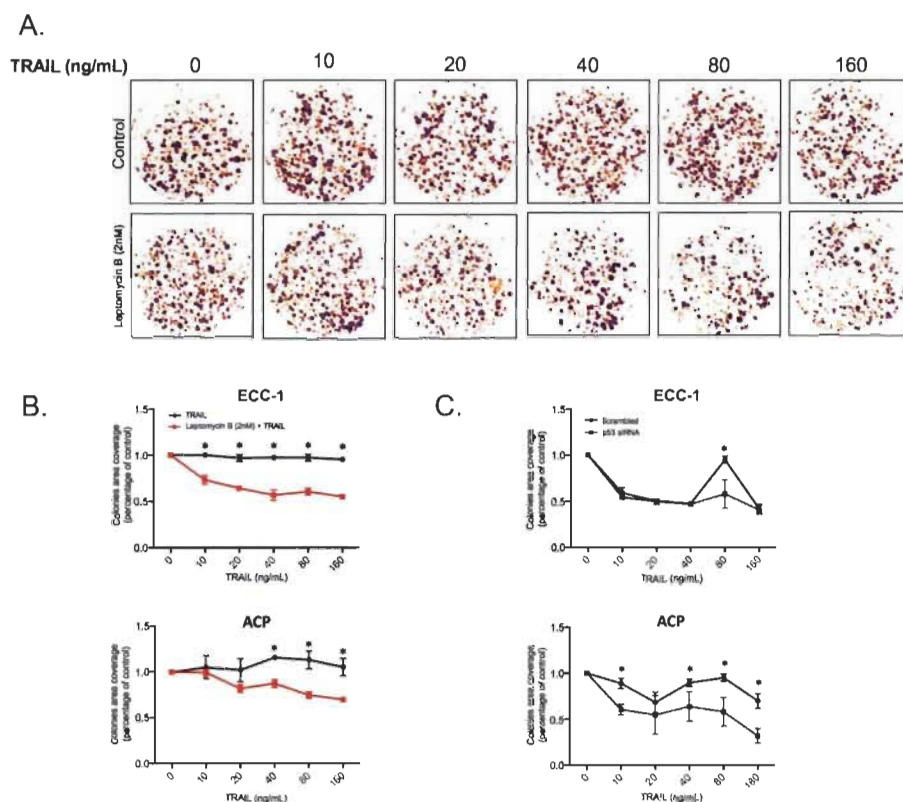


Figure 4.5 **Combination of TRAIL and leptomycin B significantly reduces tumor cells ability to clonally proliferate in a p53 independent manner.**

A. Studied cell lines were treated with increasing concentration of TRAIL (0-160ng/mL) in presence or absence of leptomycin B (2nM) for 24h and grown for 10 days. The effect on colony formation is quantified using the densitometric map obtained following the ColonyArea software methodology. Results shown are representative of three independent experiments. B. Comparison in colony coverage between single agent

therapy and combined therapy. C. Comparison of the effect of combined therapy in the context of p53 knockdown. All data are means \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$.

Leptomycin B, both singly and in combination with chemotherapeutic agents, modulates the expression of crucial apoptotic pathway genes in a cell-type specific manner

In order to determine the effect of the various treatments used in our experiments on the transcriptional landscape of the cells and further explain the observed sensitization effect, we performed qRT-PCR on A2780CP (Fig. 4.6A) and ECC-1 (Fig. 4.6B) cells. Cells were again treated with either LMB (20nM), cisplatin (10 μ M), TRAIL (100ng/mL) or a combination of LMB with cisplatin or TRAIL. Cells were then processed for qRT-PCR analysis of TRAIL receptors DR4 and DR5, TRAIL decoy receptors DcR1 and DcR2, as well as p21, p27 and PUMA, pivotal proteins involved in cell fate. These proteins were selected based on the fact that they are crucial regulators of apoptosis and TRAIL response; alternatively, they allowed us to measure p53 activation, as p21/DR4/DR5 and PUMA are well demonstrated transcriptional targets of p53. The obtained results showed that the combination of LMB and cisplatin powerfully upregulated the expression of DcR2 in A2780CP and DR5 in ECC-1. Alternatively, the combination of LMB and TRAIL induced the upregulation of DR5 in A2780CP cells, but not in ECC-1; on the other hand, the same treatment produced a strong downregulation of DcR1 in ECC-1 cells, an effect that we did not observe in A2780CP cells. In any case, however, LMB treatments, either singly or in combination with cisplatin or TRAIL did not modulate the expression of PUMA, p21 or p27. Altogether, our results suggest that the combination of LMB with TRAIL sensitize the cell to apoptotic stimuli through the upregulation of death receptors expression and the downregulation of decoy receptors expression.

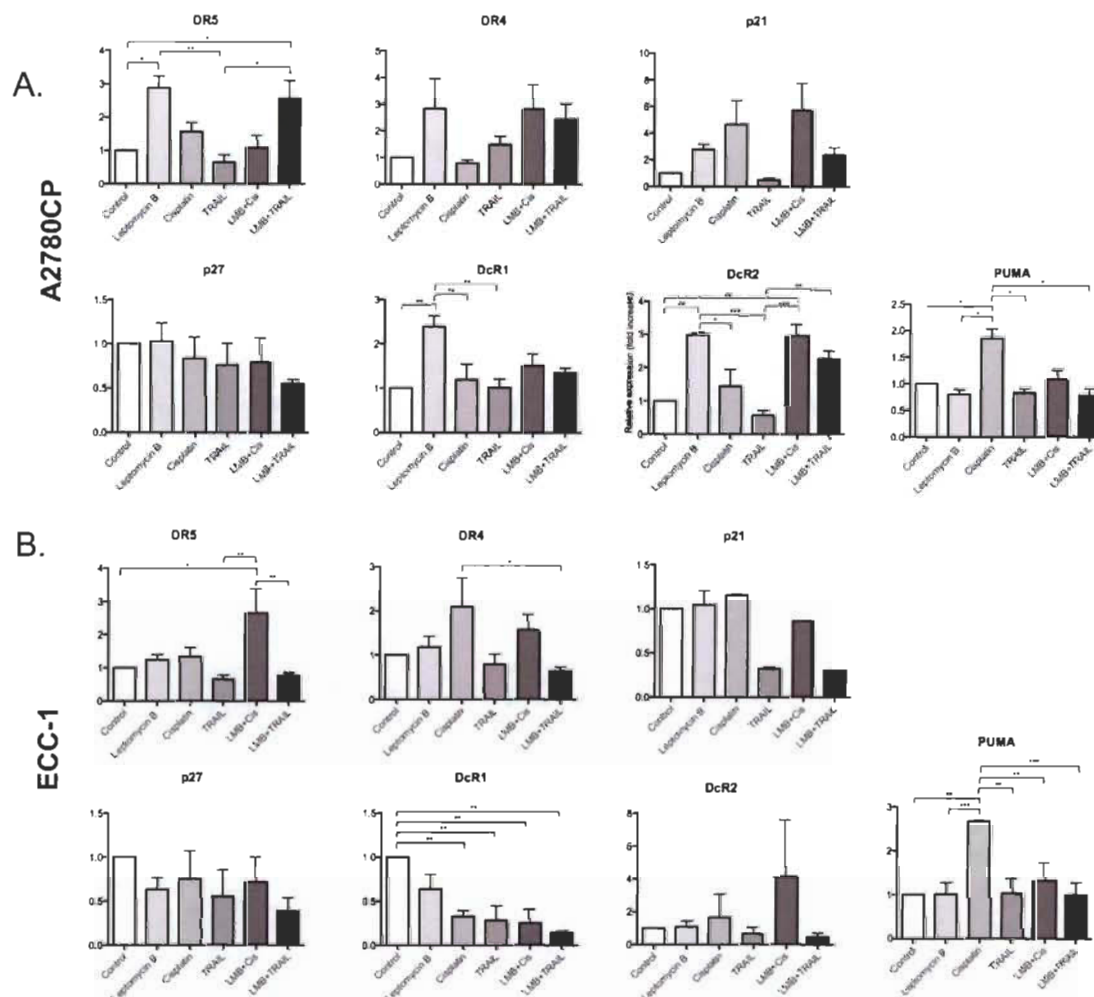


Figure 4.6 **Figure 6: Leptomycin B, both singly and in combination with chemotherapeutic agents, modulates the expression of crucial apoptotic pathway genes in a cell-type specific manner**

A. A2780CP and B. ECC-1 cell lines were treated with leptomycin B (20nM), cisplatin (10 μ M), TRAIL (100ng/mL) or a combination of leptomycin B with cisplatin or TRAIL for 24h. They were then subjected to RT-qPCR analysis to quantify the mRNA expression of DR4, DR5, p21, p27, DcR1, DcR2 and PUMA. 18S mRNA expression was used as control for qPCR results. Results shown are representative of three independent experiments. Brackets are used to show statistical differences between treatment groups. All data are means \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Discussion

Tumor cell ability to resist apoptosis induction is a complex and multifaceted problem. Resistance to various cytotoxic agents is a fundamental hurdle to our capacity to treat these diseases and clinicians face such problems on a daily basis. While not one of the most studied, TRAIL resistance is one of the most widely described acquired resistance found in gynecological malignancies patients [17-19]. We believe it is imperative that we investigate novel methods that would counter this fatal mechanism and allow clinician to employ TRAIL-based therapies. Tumor cells can acquire resistance to apoptosis through multiple type of alterations, namely in the case of molecules involved in, or opposing, the apoptotic cascade. Considering the high amount of tumor suppressors acting as potential transcription factors, we hypothesize that the mechanisms regulating the localization of such factors could prove to be highly impactful molecular targets. The karyopherin B superfamily of nuclear shuttling proteins is an excellent example of such putative targets. Multiple published studies have shown that CRM1 inhibitor LMB is an excellent inducer of apoptosis presenting a surprisingly specific cytotoxic capability; various compounds mimicking its action, such as KPT-330, have been developed and are currently undergoing clinical trials (NCT02227251; NCT03095612). While we consider that generating new molecules targeting the nuclear-cytoplasmic apparatus is an immensely promising approach, we believe the general understanding of the involved signaling pathways is still underwhelming. The exact mechanisms by which these agents, both LMB and KPT-330, exert their tumoricide role is still largely unknown; it is our opinion that a deeper understanding of these regulation systems is required if we are to add what could be an exceptional tool to our molecular therapeutic arsenal. In this paper, we have sought to explore the clinical possibilities offered by interfering with CRM1-mediated nuclear shuttling. In that context, LMB is perfectly suited for fundamental research aiming to elucidate the role of CRM1 in chemoresistance establishment, to identify the potential chemotherapeutic agents for combined therapies, and to decipher the mechanistic role of CRM1 inhibitors in tumor suppression. It is well documented that caspase-3 levels are a powerful indicator of ovarian cancer prognosis as well as resistance to treatment and could act as independent marker for overall as well as progression-free survival [53, 55]. This information is compounded by the evidence that caspase-3 rapid

turnover is a fundamental mechanism of acquired TRAIL resistance [53, 55]; the heightened levels of cleaved caspase-3 observed in our experimental context is thus highly relevant. As demonstrated by our results, TRAIL sensitization was brought in every cell line following LMB treatments, a profoundly useful effect considering the tumor-specific nature of TRAIL-induced cell death. Acquired resistance to cisplatin in A2780CP cell line was reversed, as was intrinsic resistance to cisplatin in SKOV-3 cell line albeit in a less spectacular fashion. The difference found between the ability of LMB to sensitize cells to cisplatin and TRAIL is intriguing. It is widely accepted that alkylating-like agents such as cisplatin act by cross-linking DNA strands, which cause intrinsic pathway-dependent induction of apoptosis. However, DNA damage is capable of activating the apoptotic program through multiple pathways [56], depending on the activation of multiple actors such as the p38-MAPK pathway and p53 [57, 58], both of which are regularly mutated in tumors. However, the extrinsic pathway is capable of operating some measure of cross-talk with the intrinsic pathway through Bid activation by caspase-8 [58]. It is possible that the studied cell lines present unshared mutations in those pathways, conceivably enabling LMB sensitization in a cell-specific manner; conversely, our results show that TRAIL sensitization does not seem to be dependent on cell line, underlining a chemosensitization mechanism that might be more fundamental than the one involved in cisplatin resistance, being that it is shared by all studied models. Thus, our results suggest that resistance to cisplatin and TRAIL are non-concomitant and emerge from separate molecular events in which CRM1 is involved. This is consistent with previous publications reporting that ovarian cancer cells that were resistant to TRAIL remained sensitive to other chemotherapeutic compounds [59]. In light of these results, we are allowed to think that LMB could potentially sensitize cells to a wide-range of death inducing agents, acting through both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways; these finding coalesce into a compelling treatment paradigm based on the disruption on nuclear-cytoplasmic transport. One major finding of our study is the synergistic nature of LMB, TRAIL and cisplatin induced apoptosis. As shown by the two-way ANOVA used, the concomitant use of LMB with either drugs significantly potentiate their action; therapeutically, this could not only aid in the prevention of chemoresistance, but could also allow therapeutic regimen to use lower concentration of chemotherapeutic agents. This, in turn, would greatly increase the

quality of life of patients receiving such treatments. While as much as 50% of ovarian cancer cell lines are intrinsically TRAIL resistant [59-61], very little is known regarding the mechanisms enabling TRAIL resistance to be acquired in ovarian tumors. Earlier studies have linked caspase-3 degradation to this phenotype, but our understanding of this phenomenon is still limited. If we are to use TRAIL to treat ovarian cancer, it appears vital that we develop novel strategies capable of overcoming both intrinsic and acquired resistance to this agent. One of the mechanisms proposed in this paper is related to the modulation of the expression of both decoy receptors and functional receptors of TRAIL, DcR1/2 and DR4/5, respectively. Decoy receptors inhibit TRAIL-induced apoptosis through either competitive assembly with the dimer, dysregulating DISC assembly, or through inhibition of downstream caspase cleavage [62, 63]; however, it is also widely accepted that TRAIL decoy receptors do not only act as TRAIL-inhibiting receptors. While their main function appears to be the protection of normal cells against TRAIL assaults, their exact physiological roles remain obscure. The delicate balance between functional receptors and decoy receptors is also a fundamentally intricate equilibrium, a complexity that allows the exquisite specificity of TRAIL to arise in normal tissues; interestingly, the regulation of decoy receptor expression influence on TRAIL sensitivity is not only limited to the expressing cells but also key to the tumor microenvironment, and thus, general tumor susceptibility to this process of cell suicide [64]. The effect of our combined treatments seems to promote the expression of functional receptors and diminish the expression of antagonistic receptors. Moreover, data have suggested that DcR1 overexpression could enable TRAIL resistance to occur in endometrial carcinomas [65]. Considering that decoy receptors expression is mainly controlled by p53, and possibly NF- κ B, an intricate, plurinodal network of regulation emerges [63, 66-68]; indeed, functional TRAIL receptors expression has been linked to the activation of multiple pathways, namely p53, NF- κ B and ATF3 [69-71]. Taken together, these data suggest that the expression profile of both functional and decoy TRAIL receptors are dependent upon the same proteins, resulting in a system that possess rheostat-like capabilities in inducing cell death. Our results suggest, however, that the combination of a CRM1 inhibitor sensitizes the cells to TRAIL-induced apoptosis through the concomitant upregulation of functional TRAIL receptors and the downregulation of

multiple inhibitors of the extrinsic apoptotic cascade, namely FLIP and the decoy TRAIL receptors. Our results show that p53 opposes this sensitization effect; both in the wild-type p53 cell line as well as mutated p53 cell line. These data suggest that TRAIL treatment somehow induces apoptosis in a p53 independent manner; it is possible that tumor cells hijack p53 transcriptional capabilities and, following p53 stabilization through nuclear accumulation, allow the abnormal expression of various cell-cycle progression inhibitors and apoptosis antagonists [72, 73]. The obtained results, while not significant, also show the ability of TRAIL to reduce p21 expression, even reversing its heightened expression observed in presence of LMB. While a canonical cell cycle inhibitor, it is also well demonstrated that p21 exert an anti-apoptotic effect through multiple pathway; mainly, p21 is capable of inducing the expression of a wide range of apoptotic inhibitors such as c-FLIP, XIAP and BCL-2 while also inhibiting caspases activation, either directly or through the inhibition of CDKs required for the full potency of the caspases cascade to be achieved [74]. Moreover, p53 could potentially upset the balance between TRAIL decoy and functional receptors; p53 inhibition could conceivably allow for the enrichment of functional TRAIL receptors and subsequent TRAIL sensitization. It is, of course, not excluded that the expression of functional TRAIL receptors, as well as their inhibitory homologs, might be modulated by post-transcriptional mechanism such as miRNA interference; considering the fundamental role of CRM1 in the export of miRNA, it is highly plausible that some measure of miRNA dynamic is altered following treatments [75]. Many groups have already reported positive, as well as negative effects of certain miRNA on TRAIL pro-apoptotic capabilities [76]; further experiments and future studies will certainly allow us to decipher the roles of such mechanisms in the sensitization effect of LMB to TRAIL. The results obtained in figure 2.4C are also puzzling, considering the increased PARP cleavage with a drastically reduced cleaved caspase-3 levels. It is possible that, in that case, alternative caspases such as caspase-6 and caspase-7, take over the role of caspase-3 in directing the apoptotic program. Furthermore, the results obtained in the colony formation assay, while confirming the increased effectiveness of the combined treatment in the context of p53 knockdown, seems to show that this loss of caspase-3 cleavage does not reduce treatment effectiveness in ECC-1.

Conclusions

Taken together, our results suggest that the combination of LMB and TRAIL synergistically induces apoptosis in a p53 independent manner and that p53 mutation/deletion could plausibly potentiate this effectiveness. We believe that the current overall low potency of synthetic TRAIL homologs represents the most critical hurdle to the success of TRAIL-based therapy; in that context, we anticipate that our results could, given time, form the basis of novel therapeutic strategies involving the targeting of nuclear-cytoplasmic shuttling mechanisms in order to sensitize tumor cells to the effect of TRAIL.

References

1. Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh JY, Lee HJ, Tsang BK: Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Ann N Y Acad Sci* 2012, 1271:58-67.
2. Chaudhry P, Asselin E: Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009, 16:363-380.
3. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R: The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995, 82:475-483.
4. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW: CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997, 90:1051-1060.
5. Turner JG, Dawson J, Sullivan DM: Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* 2012, 83:1021-1032.
6. Shao C, Lu C, Chen L, Koty PP, Cobos E, Gao W: p53-Dependent anticancer effects of leptomycin B on lung adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011, 67:1369-1380.
7. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, Yoshida M: Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* 1998, 242:540-547.
8. Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM: A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of

- subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 1999, 18:1660-1672.
9. Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, Dickson KA, Zhu Y, Clarkson A, Gard GB, Maidens J, Valmadre S, Clifton-Bligh R, Marsh DJ: Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci Rep* 2016, 6:26191.
 10. O'Hara AJ, Bell DW: The genomics and genetics of endometrial cancer. *Adv Genomics Genet* 2012, 2012:33-47.
 11. Pathria G, Wagner C, Wagner SN: Inhibition of CRM1-mediated nucleocytoplasmic transport: triggering human melanoma cell apoptosis by perturbing multiple cellular pathways. *J Invest Dermatol* 2012, 132:2780-2790.
 12. Naniwa J, Kigawa J, Akeshima R, Kanamori Y, Itamochi H, Oishi T, Iba T, Terakawa N: Leptomycin B enhances CDDP-sensitivity via nuclear accumulation of p53 protein in HPV-positive cells. *Cancer Sci* 2003, 94:1099-1103.
 13. Lu C, Shao C, Cobos E, Singh KP, Gao W: Chemotherapeutic sensitization of leptomycin B resistant lung cancer cells by pretreatment with doxorubicin. *PLoS One* 2012, 7:e32895.
 14. Vogler M, Durr K, Jovanovic M, Debatin KM, Fulda S: Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene* 2007, 26:248-257.
 15. Ricci MS, Kim SH, Ogi K, Plastaras JP, Ling J, Wang W, Jin Z, Liu YY, Dicker DT, Chiao PJ, et al: Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell* 2007, 12:66-80.
 16. Brasseur K, Gevry N, Asselin E: Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* 2017, 8:4008-4042.
 17. Khaider NG, Lane D, Matte I, Rancourt C, Piche A: Targeted ovarian cancer treatment: the TRAILS of resistance. *Am J Cancer Res* 2012, 2:75-92.
 18. Farooqi AA, Yaylim I, Ozkan NE, Zaman F, Halim TA, Chang HW: Restoring TRAIL mediated signaling in ovarian cancer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014, 62:459-474.
 19. Llobet D, Eritja N, Yeramian A, Pallares J, Sorolla A, Domingo M, Santacana M, Gonzalez-Tallada FJ, Matias-Guiu X, Dolcet X: The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms. *Eur J Cancer* 2010, 46:836-850.

20. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Rue M, Comella JX, Matias-Guiu X: FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab Invest* 2005, 85:885-894.
21. Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM: Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res* 2001, 61:7255-7263.
22. El-Guendy N, Rangnekar VM: Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Experimental cell research* 2003, 283:51-66.
23. Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM: Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005, 25:1146-1161.
24. Joshi J, Fernandez-Marcos PJ, Galvez A, Amanchy R, Linares JF, Duran A, Pathrose P, Leitges M, Canamero M, Collado M, et al: Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis. *EMBO J* 2008, 27:2181-2193.
25. Zhao Y, Rangnekar VM: Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. *Cancer Biol Ther* 2008, 7:1867-1874.
26. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E: Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Molecular and cellular biology* 2012, 32:826-839.
27. Jagtap JC, Dawood P, Shah RD, Chandrika G, Natesh K, Shiras A, Hegde AS, Ranade D, Shastry P: Expression and regulation of prostate apoptosis response-4 (Par-4) in human glioma stem cells in drug-induced apoptosis. *PLoS One* 2014, 9:e88505.
28. Chaudhry P, Fabi F, Singh M, Parent S, Leblanc V, Asselin E: Prostate apoptosis response-4 mediates TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 2014, 5:e1044.
29. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E: Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer* 2004, 3:7.
30. Farnell YZ, Ing NH: The effects of estradiol and selective estrogen receptor modulators on gene expression and messenger RNA stability in immortalized sheep endometrial stromal cells and human endometrial adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 84:453-461.
31. Yaginuma Y, Westphal H: Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991, 51:6506-6509.

32. Weigelt B, Warne PH, Lambros MB, Reis-Filho JS, Downward J: PI3K pathway dependencies in endometrioid endometrial cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2013, 19:3533-3544.
33. Mo B, Vendrov AE, Palomino WA, DuPont BR, Apparao KB, Lessey BA: ECC-1 cells: a well-differentiated steroid-responsive endometrial cell line with characteristics of luminal epithelium. *Biol Reprod* 2006, 75:387-394.
34. Schirmer U, Doberstein K, Rupp AK, Bretz NP, Wuttig D, Kiefel H, Breunig C, Fiegl H, Muller-Holzner E, Zeillinger R, et al: Role of miR-34a as a suppressor of L1CAM in endometrial carcinoma. *Oncotarget* 2014, 5:462-472.
35. Fass L, Felder M, Patankar MS, Kapur AK: Abstract 3211: Citral is the major component of ginger-derived terpenes to mediate p53-dependent apoptosis in cancer cells. *Cancer Research* 2014, 74:3211-3211.
36. Jin X, Gossett DR, Wang S, Yang D, Cao Y, Chen J, Guo R, Reynolds RK, Lin J: Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells. *Br J Cancer* 2004, 91:1808-1812.
37. Janicek MF, Angioli R, Unal AD, Sevin BU, Madrigal M, Estape R, Averette HE: p53 interference and growth inhibition in p53-mutant and overexpressing endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 1997, 66:94-102.
38. Richardson GS, Dickersin GR, Atkins L, MacLaughlin DT, Raam S, Merk LP, Bradley FM: KLE: a cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1984, 17:213-230.
39. Brasseur K, Leblanc V, Fabi F, Parent S, Descoteaux C, Berube G, Asselin E: ERalpha-targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum(II) hybrid. *Endocrinology* 2013, 154:2281-2295.
40. Lu X, Errington J, Curtin NJ, Lunec J, Newell DR: The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin Cancer Res* 2001, 7:2114-2123.
41. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N: Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* 2013, 4:2126.
42. Kobayashi N, Abedini M, Sakuragi N, Tsang BK: PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *J Ovarian Res* 2013, 6:7.
43. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 1983, 43:5379-5389.

44. Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rochefort H, Clinton GM: SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 55:279-289.
45. Guzman C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J, Abankwa D: ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One* 2014, 9:e92444.
46. Greco WR, Faessel H, Levasseur L: The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers? *J Natl Cancer Inst* 1996, 88:699-700.
47. Slinker BK: The statistics of synergism. *J Mol Cell Cardiol* 1998, 30:723-731.
48. Mizuno H, Kitada K, Nakai K, Sarai A: PrognoScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Med Genomics* 2009, 2:18.
49. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, et al: Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2008, 14:5198-5208.
50. Baribeau S, Chaudhry P, Parent S, Asselin E: Resveratrol inhibits cisplatin-induced epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cell lines. *PLoS One* 2014, 9:e86987.
51. Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E: Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008, 13:259-271.
52. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E: Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Mol Cell Biol* 2012, 32:826-839.
53. Lane D, Cote M, Grondin R, Couture MC, Piche A: Acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis in human ovarian cancer cells is conferred by increased turnover of mature caspase-3. *Mol Cancer Ther* 2006, 5:509-521.
54. Jang BC, Paik JH, Jeong HY, Oh HJ, Park JW, Kwon TK, Song DK, Park JG, Kim SP, Bae JH, et al: Leptomycin B-induced apoptosis is mediated through caspase activation and down-regulation of Mcl-1 and XIAP expression, but not through the generation of ROS in U937 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2004, 68:263-274.
55. Materna V, Surowiak P, Markwitz E, Spaczynski M, Drag-Zalesinska M, Zabel M, Lage H: Expression of factors involved in regulation of DNA mismatch repair- and apoptosis pathways in ovarian cancer patients. *Oncol Rep* 2007, 17:505-516.

56. Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003, 22:7265-7279.
57. Wada T, Penninger JM: Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004, 23:2838-2849.
58. Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007, 35:495-516.
59. Lane D, Cartier A, L'Esperance S, Cote M, Rancourt C, Piche A: Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2004, 93:594-604.
60. Siervo-Sassi RR, Marrangoni AM, Feng X, Naoumova N, Winans M, Edwards RP, Lokshin A: Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2003, 190:61-72.
61. Vignati S, Codegoni A, Polato F, Broggin M: Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs. *Eur J Cancer* 2002, 38:177-183.
62. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O: Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 2006, 26:7046-7055.
63. Kang S, Park SY, Lee HJ, Yoo YH: TRAIL upregulates decoy receptor 1 and mediates resistance to apoptosis in insulin-secreting INS-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396:731-735.
64. O'Leary L, van der Sloot AM, Reis CR, Deegan S, Ryan AE, Dhami SP, Murillo LS, Cool RH, Correa de Sampaio P, Thompson K, et al: Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene* 2016, 35:1261-1270.
65. Tarragona J, Llecha N, Santacana M, Lopez S, Gatus S, Llobet D, Dolcet X, Palomar-Asenjo V, Gonzalez-Tallada FJ, Matias-Guiu X: DcR1 expression in endometrial carcinomas. *Virchows Arch* 2010, 456:39-44.
66. Toscano F, Fajoui ZE, Gay F, Lalaoui N, Parmentier B, Chayvialle JA, Scoazec JY, Micheau O, Abello J, Saurin JC: P53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells. *Oncogene* 2008, 27:4161-4171.
67. Zhao XD, Deng HB, Lu CL, Bao YX, Lu X, Deng LL: Association of EGFR and KRAS mutations with expression of p-AKT, DR5 and DcR1 in non-small cell lung cancer. *Neoplasma* 2017, 64:182-191.

68. Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY: Decoy receptor 2 (DcR2) is a p53 target gene and regulates chemosensitivity. *Cancer Res* 2005, 65:9169-9175.
69. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S: Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. *Oncogene* 2012, 31:2210-2221.
70. Kong F, You H, Zhao J, Liu W, Hu L, Luo W, Hu W, Tang R, Zheng K: The enhanced expression of death receptor 5 (DR5) mediated by HBV X protein through NF-kappaB pathway is associated with cell apoptosis induced by (TNF-alpha related apoptosis inducing ligand) TRAIL in hepatoma cells. *Virology* 2015, 12:192.
71. Maldonado ME, Bousserouel S, Gosse F, Lobstein A, Raul F: Implication of NF-kappaB and p53 in the expression of TRAIL-death receptors and apoptosis by apple procyanidins in human metastatic SW620 cells. *Biomedica* 2010, 30:577-586.
72. Janicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K: The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ* 2008, 15:959-976.
73. Bartke T, Siegmund D, Peters N, Reichwein M, Henkler F, Scheurich P, Wajant H: p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 2001, 20:571-580.
74. Janicke RU, Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K: The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* 2007, 6:407-413.
75. Muqbil I, Bao B, Abou-Samra AB, Mohammad RM, Azmi AS: Nuclear export mediated regulation of microRNAs: potential target for drug intervention. *Curr Drug Targets* 2013, 14:1094-1100.
76. Bhere D, Tamura K, Wakimoto H, Choi SH, Purow B, Debatisse J, Shah K: microRNA-7 upregulates death receptor 5 and primes resistant brain tumors to caspase-mediated apoptosis. *Neuro Oncol* 2018, 20:215-224.

CHAPITRE V

AZD5363 AND DOXORUBICIN SYNERGISTICALLY INDUCE APOPTOTIC CELL DEATH IN ENDOMETRIAL AND OVARIAN CANCER CELL LINES

François Fabi, Pascal Adam, François Demontigny, Keven Vincent, Sophie Parent, Laurence Tardif, Daniel Garcia Casal, Monique Cadrin, Eric Asselin

Le contenu de ce chapitre est en cours de préparation pour soumission en anglais dans la revue *Molecular Cancer*. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs.

5.1 Contribution des auteurs

François Fabi a conçu et effectué la majorité des expérimentations présentées dans l'article. François Fabi a écrit la totalité du manuscrit. Pascal Adam, étudiant au doctorat, a procédé à certaines expériences de Western blots. Keven Vincent, François Demontigny et Daniel Garcia Casal, lors de leurs stages de biologie médicale, ont accomplis certaines expériences de Western blots, de culture cellulaire et d'immunofluorescence. Sophie Parent, assistante de recherche, a aidé à la mise au point des protocoles et à la mise au point des techniques de PCR quantitatives. Laurence Tardif, étudiante à la maîtrise, a procédé à certaines expériences de Western blots. Monique Cadrin a supporté le projet par l'élaboration de certaines expériences et en révisant certains résultats. Eric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et a supervisé l'élaboration et la conception expérimentale de ce manuscrit.

5.2 Résumé de l'article (français)

La voie de signalisation PI3K/Akt est l'un des régulateurs les plus fondamentaux des processus cellulaires et tient une place centrale dans l'intégration des décisions du

destin cellulaire. Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que le réseau de signalisation entourant PI3K/Akt soit le sentier signalétique le plus souvent altéré dans les cancers. Malgré le fait qu'une grande quantité de travail a été faite afin d'élucider le rôle de ces voies de signalisation dans l'établissement de la chimiorésistance, très peu de stratégies thérapeutiques impliquant des inhibiteurs de PI3K/Akt ont été examinées, et ce, particulièrement dans le cas des cancers gynécologiques. Dans cet article, nous avons étudié la capacité du NVP-BEZ235, un inhibiteur bivalent de PI3K et de mTOR et de l'AZD5363, un inhibiteur de la kinase Akt, à moduler l'axe de signalétique PI3K/Akt/mTOR et de permettre une sensibilisation à l'action cytotoxique du cisplatine et de la doxorubicine. Nos résultats montrent que le NVP-BEZ235 sensibilise les cellules cancéreuses préférentiellement au cisplatine alors que l'AZD5363 fait de même mais pour la doxorubicine. Les deux inhibiteurs semblent capables de réduire la phosphorylation de S6 mais l'AZD5363 est plus efficace, particulièrement dans le cas de la phosphorylation de GSK3 β . De plus, l'AZD5363 semble promouvoir la localisation nucléaire de FOXO1 et de p53 tout en réduisant la phosphorylation de BAD. Finalement, la combinaison de l'AZD5363 avec la doxorubicine induit fortement l'apoptose dans les cellules cancéreuses, un effet qui se traduit par la robuste capacité synergique des deux composés à réduire la capacité de réplication clonale des cellules étudiées. En somme, nos résultats suggèrent que la combinaison de l'AZD5363 et de la doxorubicine pourrait se revêtir un potentiel clinique intéressant en agissant comme une stratégie thérapeutique capable de surmonter la problématique de la chimiorésistance des cancers gynécologiques.

5.3 Article complet (anglais) : AZD5363 and doxorubicin synergistically induce apoptotic cell death in endometrial and ovarian cancer cell lines

Abstract

The PI3K/Akt signaling pathway is one of the most fundamental regulator of cellular processes and holds a central place in the integration of cell fate decisions. In that context, it is not surprising that the PI3K/Akt network is the most frequently altered signaling system in human cancer. While extensive work has been conducted in the past with the objective of elucidating these pathways role in chemoresistance, very little

therapeutic strategies involving PI3K/Akt inhibitors have been examined, especially in the context of gynecological malignancies. In this paper, we have studied the ability of NVP-BEZ235 and AZD5363, respectively a PI3K/mTOR inhibitor and an Akt inhibitor, to modulate the PI3K/Akt/mTOR pathway and, possibly, sensitize cancer cells to the cytotoxic activity of cisplatin and doxorubicin. Our results show that NVP-BEZ235 sensitize cells preferentially to cisplatin while AZD5363 more robustly sensitize cells to doxorubicin. Both inhibitors are capable of reducing S6 phosphorylation, but AZD5363 is more effective in reducing GSK3 β phosphorylation. Additionally, AZD5363 is capable of inducing FOXO1 and p53 nuclear localization and reduces BAD phosphorylation. Finally, the combination of AZD5363 and doxorubicin can induce apoptosis in cells, an effect that translates to the combined therapy effectively reducing clonal replication in cells. Taken together, our findings propose a novel, highly potent therapy capable of circumventing the hurdle of chemoresistance in gynecological cancer cell lines.

Introduction

The PI3K/Akt signaling pathway is one of the most fundamental regulator of cellular processes and holds a central place in the integration of cell fate decisions. In that context, it is not surprising that the PI3K/Akt network is the most frequently altered signaling system in human cancer [1, 2]. Not only is this pathway mutationnally overrepresented, along the p53 axis of regulation, but novel studies using powerful and refined methods of analysis have shown that PI3K, along Akt1 and the mTOR axis, are significantly more involved in cancer development than any other genes; the authors also posit, and demonstrate, that mutation should not be construed as the strongest predictor of molecular role in oncogenesis but rather that protein overexpression, and thus presumably enhanced activation and signaling, seemingly is the most impactful event in tumor development [3]. Taken together, these data points to the overall crucial role of PI3K/Akt signaling axis in molecular dysregulation allowing tumorigenesis, their impact on the ability of the cell to substract themselves from their own endogenous, orderly system of homeostatic dynamics. In accordance with this hypothesis, the PI3K/Akt/mTOR axis of regulation has been well demonstrated to be of the utmost importance in the capability of

tumor cell to resist apoptosis induced by various therapies; this role is particularly well recognized in the context of gynecological malignancies [4-10]. More precisely, ovarian cancer, as well as endometrial cancer, are both tumor type that exhibit high level of chemoresistance that is linked to overactivation of Akt, in some cases directly influenced by PTEN loss, in response to chemotherapeutic insults [4, 6, 9, 11]. Ovarian cancer generally develop resistance early on due to late diagnosis; on the other hand, while a large portion of endometrial cancer initially respond positively to chemotherapy, the majority of recurrent endometrial malignancies will not display such sensitivity [12-19]. It is therefore necessary that we develop novel targeted therapeutic strategies that enhance chemosensitivity of these tumor type and restore treatment effectiveness; the overwhelming representation of mutations involving erratic activation of the PI3K/Akt/mTOR axis also provide a strong support for the use of pharmacological tools suppressing the functions of this molecular pathway.

Accordingly, multiple strategies can be used to inhibit the activation and signaling events that unfold upon PI3K stimulation. While the earliest molecules, such as LY294002 and Wortmannin, acted in an upstream fashion by directly inhibiting PI3Ks, they were limited in their use because of their poor pharmacodynamics and low tolerability [20-22]. However, their ability to interfere with the PI3K/Akt/mTOR pathway and their effectiveness *in vitro* underlined the robust potential of this molecular strategy in cancer therapy. Novel inhibitors of PI3K were thus developed, exhibiting powerful pharmacological capabilities, high bioavailability as well as advantageous dosability in patients. One such compound is NVP-BEZ235, an orally bioavailable dual PI3K/mTOR inhibitor capable of selectively abrogating class I PI3K as well as mTOR kinase [23]. On the other hand, AZD5363 has been developed to act directly on all three isoforms of Akt, downstream of PI3K [24]. This molecule, rather than acting as a allosteric inhibitor of the Akt kinases, act as a potent ATP competitive kinase domain inhibitor, preventing Akt phospho-transferase activity. In that context, we endeavoured to measure whether either compound could potentiate the pro-apoptotic ability of cisplatin and doxorubicin through the inhibition of the PI3K/Akt/mTOR axis of signaling. Using multiple gynecological cancer cell lines as models, we first evaluated the ability of each drug to modulate key signaling pathways. We then combined both kinase inhibitors with both chemotherapeutic

agents to establish whether synergistic effects could be observed. After underlining the favorable combination of NVP-BEZ235 with cisplatin and AZD5363 with doxorubicin, we further characterized the molecular events explaining this enhanced effectiveness. Our results suggest that AZD5363, when combined with doxorubicin, allows a synergistic sensitization of cancer cells to the latter molecule through the inhibition of Akt and mTOR signaling pathways, downregulation of key inhibitors of apoptosis as well as nuclear localization of tumor suppressors such as FOXO1 and p53.

Methods

Cell lines and reagents

HEC-1A and SKOV-3 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). A2780 and A2780CP were kindly provided by Dr. G. Peter Raaphorst (Ottawa regional cancer center, Ottawa, Canada). Ishikawa cells were kindly provided by Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Montréal, Canada). ECC-1 cells were kindly provided by Nicolas Gévry (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada). All the antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) with the exception of the anti-rabbit secondary antibody used for western blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and for the Alexa Fluor 488 tagged anti-rabbit secondary antibody, which was obtained from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). NVP-BEZ235, AZD5363, cisplatin and doxorubicin were obtained from Selleckchem (Houston, TX, USA).

MTT assays

Briefly, plates were seeded with 180µL of normal and cancer cells in suspension (for Ishikawa, 16 000; ECC-1, 14 000; A2780/CP, 16 000; HEC-1A, 12 000; SKOV-3, 12 000) in medium using 96-wells plates. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24h. Cisplatin, doxorubicin, AZD5363 and NVP-BEZ235 were diluted in fresh medium, serially diluted and added to the plates to obtain the final indicated concentrations. Cells were then incubated for another 24h after which 10µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5mg/mL in PBS) were added to the wells. Four hours later, 100 μ L of the solubilization solution (10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0,01 M HCl) were added and the plates incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The optical density was read using a FluoStar Optima BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA) at 565nm. Each experiments were performed in duplicate on the same plate.

Western blot analysis

After the end of the treatment period both floating and attached cells were collected and cell lysate was done using cold radioimmunoprecipitation assay lysis buffer containing protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), followed by three freeze–thaw cycles. Proteins were measured using the Bio-Rad DC protein assay. Western blotting was performed following a classical protocol. Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies were used, and the blot was developed using SuperSignal West Femto substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), as described by the manufacturer, using a cooled CCD camera (UVP System). The shown results are representative of at least three independent experiments.

Colony formation assays

Cells were plated at a confluence of 2000 cells per well in a 6 wells plate and grown for 24 h. Cells were then treated for 24h after which the media was replaced. Cells were allowed to grow for ten days and media was replaced every 5 days. After 10 days, cells were washed with PBS and fixed in ice-cold formalin for 10 min. After fixation, colonies were colored with Giemsa Stain 0.4% for 5 min. Plates were then washed with running water, allowed to dry and colonies were photographed using a cooled CCD camera. Images were quantified using the ColonyArea software[25].

Immunofluorescence

Cells were treated as described above and were grown in 6-well plates containing sterile coverslips. On the day of analysis, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized for 10 min using 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate at

room temperature. After blocking with 4% normal goat serum blocking for 1 h, cells were incubated with primary antibody at a concentration of 1 μ g/mL or isotypic control antibody for 1 h. After incubation with primary antibody, cells on the coverslips were washed three times with PBS and then incubated with Alexa Fluor 488 secondary antibodies (1:800 dilution) for 30 min at room temperature in dark conditions. Cells were counterstained with Hoechst 33248 (0.25 μ g/ml) for 5 min, and slides were mounted using Slowfade gold antifading reagent (Invitrogen) and viewed under a Leica TCS SP8 confocal microscope, using a 63x immersion lens (Leica Microsystems, Concord, Ontario, Canada).

Statistical analyses

Statistical analysis was done by one-way analysis of variance with Tukey's *post hoc* test or Student's *t*-test where appropriate. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. All analyses were performed using GraphPad PRISM software, version 3.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

NVP-BEZ235 and AZD5363 are capable of interfering with the PI3K/Akt/mTOR axis in ovarian and endometrial cancer cell lines

We first studied the ability of AZD5363 and NVP-BEZ235 to inhibit various proteins that act as markers of PI3K/Akt/mTOR activation. Completely upstream of that signaling pathway, we measured the complete activation of Akt through phosphorylation on serine 473 [2]; we also measured GSK3 β phosphorylation on serine 9, a direct target of activated Akt, and an effective measure of GSK3 β inhibition that reduces its ability to act as a tumor suppressor [26]. On the other hand, we measured phosphorylation of p70S6K on Thr389, a direct marker of growth factor influence on mTOR axis activation and a critical residue post-translational modification necessary for p70S6K activation that could potentially act as an indicator of therapy effectiveness [27, 28]; consequently, we also measured S6 protein phosphorylation on serine 235/236, a direct substrate of p70S6K (p70) of which the phosphorylation allows 5'TOP dependant translation and a potential marker of chemoresistance [29, 30]. Supp. Fig 5.6 shows MTT preliminary data pertaining

to cell lines sensitivity to both chemotherapeutic compounds as well as inhibitors when treated singly.

We thus treated A2780, an ovarian chemosensitive cell line, A2780CP, an allogenic cell line derived from A2780 that is highly resistant to both doxorubicin and cisplatin, Ishikawa, an endometrial cisplatin sensitive, doxorubicin resistant cell line and finally ECC-1, an endometrial cisplatin and doxorubicin resistant cell line, with increasing doses of NVP-BEZ235 or AZD5363 (Fig. 5.1). Results show that NVP-BEZ235 is capable, at low doses, of fully inhibiting Akt phosphorylation on serine 473, in all tested cell lines while not inducing apoptosis, as shown by the absence of PARP cleavage. Incidentally, p70 phosphorylation was also reduced in correlation with the loss of Akt phosphorylation, as was the phosphorylation of p70 prime substrate, S6. Interestingly, NVP-BEZ235 seemed to be incapable of fully abrogating S6 phosphorylation in Ishikawa cell line, even at high dose. Finally, NVP-BEZ235 was unable to impede GSK3 β phosphorylation at all doses, underlining the inability of the drug to completely abrogate GSK3 β inactivation by Akt. AZD5363, on the other hand, seemingly heightened Akt phosphorylation on serine 473, an effect that is cogent with its pharmacological activity as an ATP competitive inhibitor. Additionally, AZD5363 at high doses was capable of inducing apoptotic cell death in A2780 and Ishikawa cell lines. Interestingly, AZD5363 seemed to increase the phosphorylation of p70, which could be due to the high homology of the ATP pocket present between Akt and p70 [24]. Nonetheless, S6 phosphorylation was completely abrogated even at low doses, underlining the ability of AZD5363 to interfere with mTOR axis activation. Finally, the compound was very effective in reducing GSK3 β phosphorylation. Overall, the results suggest that AZD5363 was more effective in impeding the Akt/mTOR pathway activation than NVP-BEZ235, considering their similar effects at various doses with the added AZD5363 capability of robustly reducing GSK3 β phosphorylation.

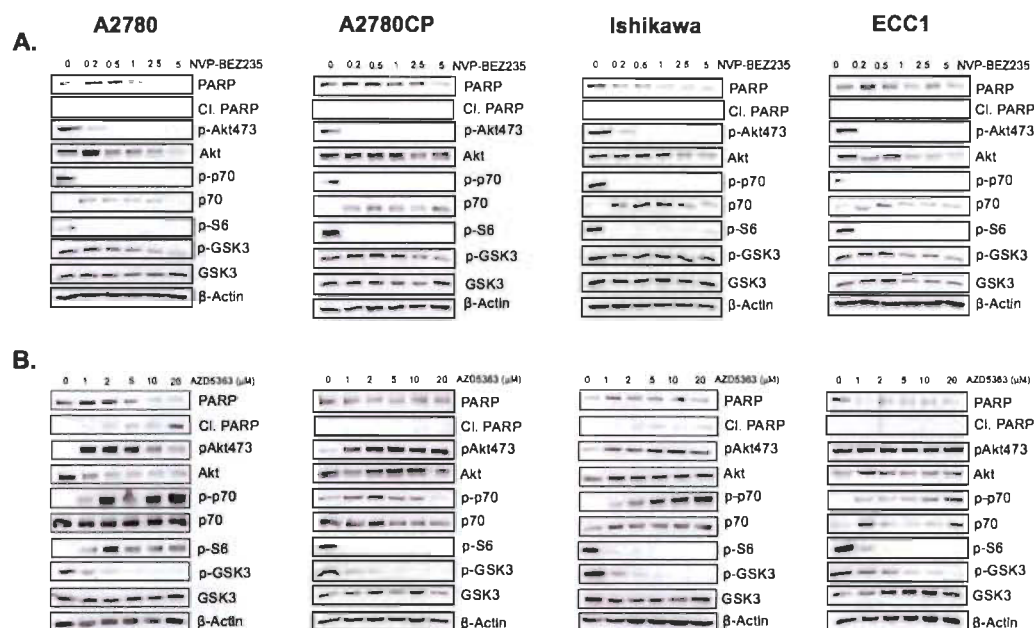


Figure 5.1 NVP-BEZ235 and AZD5363 modulate signaling pathways in a dose-dependant manner.

A. Cell lines were treated with increasing concentration of NVP-BEZ235 (0-5 μ M). Western blot was performed using relevant antibodies and β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. **B.** Cell lines were treated with increasing concentration of AZD5363 (0-20 μ M). Western blot was performed using relevant antibodies and β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

NVP-BEZ235 and AZD5363 are capable of enhancing the ability of cisplatin and doxorubicin of reducing cancer cell viability

The previously obtained data suggested that the studied compound were capable of modulating the PI3K/Akt/mTOR axis. We thus sought to determine if the combination of either NVP-BEZ235 or AZD5363 with cisplatin or doxorubicin could potentiate the effects of these cytotoxic molecules in the context of cancer cell lines. We thus proceeded to treat cells with a fixed doses of inhibitors concomitantly with increasing doses of chemotherapeutic drugs for 24h. Concentration of 20 μ M of AZD5363 were used in cellular models with robust effects [31, 32]; results found in figure 5.1 showed that 20 μ M was effective in reducing pathway activations in all cell lines. It has also been reported that doses exceeding 10 μ M are easily achievable at tolerable *in vivo* dosages, underlining

the pharmacodynamic capabilities of the compound. In parallel, our previous experiments, in addition to studies performed by other groups, had suggested that a NVP-BEZ235 at a dose of 1 μ M was effective when combined with cisplatin and was capable, by itself, of inhibiting multiple PI3K-dependant pathways [33-36]. The results obtained in figure 5.1 confirmed that this dose could potentially inhibit signaling pathways but was mostly incapable of inducing apoptosis in tested cell lines. We performed MTT assays to determine the ability of each combination to achieve some form of synergy in reducing cell viability (Fig. 5.2A). The results showed that in A2780, AZD5363 was significantly more effective in sensitizing cells to doxorubicin treatments. This was also the case in A2780CP cells, where AZD5363 sensitized cells to doxorubicin more effectively than NVP-BEZ235; however, the latter was significantly more effective in sensitizing A2780CP cells to cisplatin. In the case of Ishikawa cell lines, no significant differences was found in the case of doxorubicin while NVP-BEZ235 allowed sensitization to cisplatin treatments. Finally, in ECC-1, both doxorubicin and cisplatin sensitivity was enhanced in cells treated with AZD5363. We also wanted to determine the relative effectiveness of both inhibitor compound when compared directly to each other. To evaluate their respective effectiveness at similar dosages, cells were treated with AZD5363 or NVP-BEZ235 at 5 μ M and Western blots were performed (Fig. 5.2B). The results show that, altogether, AZD5363 is clearly more effective in reducing S6 phosphorylation and GSK3 β phosphorylation, two important downstream targets of the PI3K/Akt/mTOR axis. Taken together, these results suggest that the AZD5363 preferentially potentiate the action of doxorubicin while NVP-BEZ235 presents a similar effect with cisplatin; however, AZD5363 appears to more powerfully impede Akt/mTOR activity.

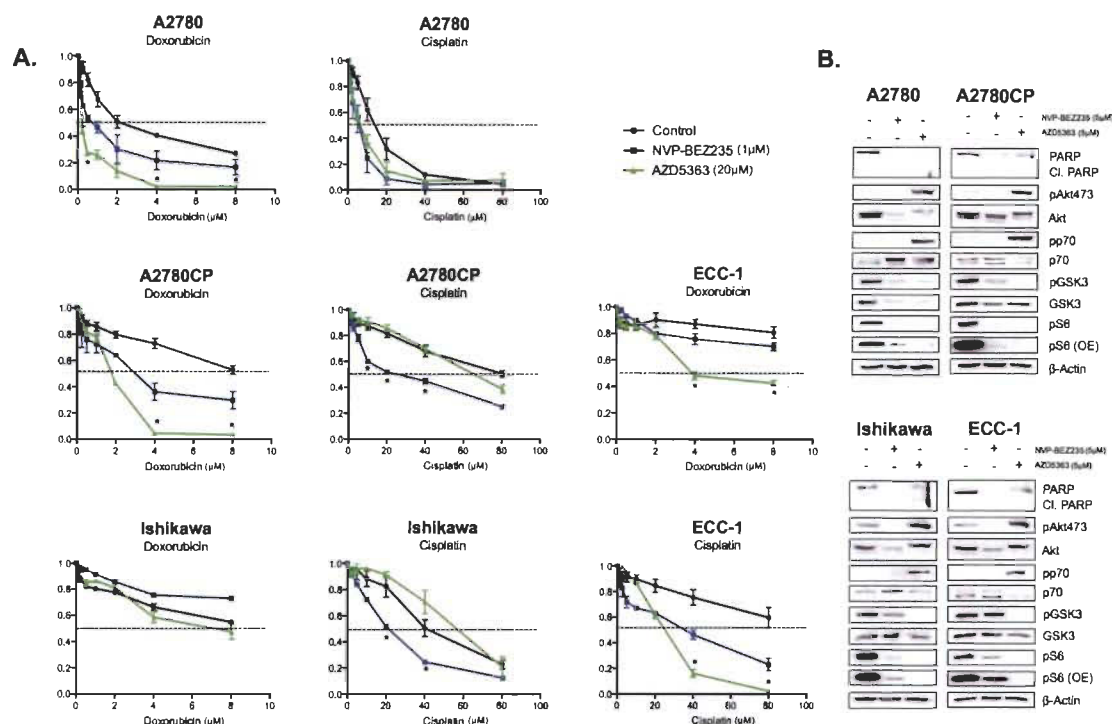
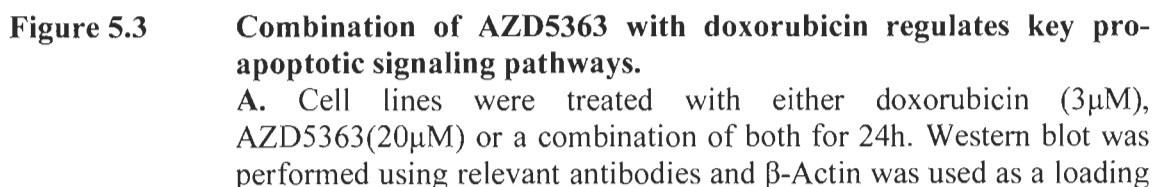


Figure 5.2 Combination of AZD5363 with doxorubicin induces apoptosis in gynecological cancer cell lines

A. Cell lines were treated with either cisplatin (10μM), NVP-BEZ235(1μM) or a combination of both for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. **B.** Cell lines were treated with either doxorubicin (3μM), AZD5363(20μM) or a combination of both for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β-Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments

AZD5363 potentiates the activity of doxorubicin and allow the induction of apoptosis

Considering the parameters suggested by the previously obtained results, we then endeavoured to combine treatments of doxorubicin (3μM) with AZD5363 (20μM), a dose that is, when used singly, incapable of inducing apoptosis in resistant cell lines, and observe the obtained synergistic effects. Accordingly, considering the seemingly more effective combination of NVP-BEZ235 with cisplatin, cells were treated in parallel with cisplatin (10μM) and NVP-BEZ235 (1μM). Cells were again treated for 24h with either drugs or a combination of both. Multiple cell lines were used to ascertain the validity and applicability of our findings; briefly, SKOV3 are an aggressive, high-grade ovarian cancer cells resistant to cisplatin and doxorubicin while Hec-1A cells are medium grade



control. Results shown are representative of three independent experiments **B**. Immunofluorescence experiments were conducted in order to determine the effect of the previous treatments on p53 and FOXO1 subcellular localization.

Combination of AZD5363 and doxorubicin regulates key modulators of the apoptotic responses as well as the translocalisation of tumor suppressors

In order to characterize more effectively the effect of AZD5363 combination with doxorubicin, we elected to conduct further experiments involving A2780CP and ECC-1 cell lines as they are both adequate representation of their respective cancer type. Again, cells were submitted to 24 hours treatments using doses of 3 μ M for doxorubicin and 20 μ M AZD5363 and additional Western blots experiments were performed (Fig. 5.4A). Doxorubicin seemed to allow p53 stabilization in both cell lines, an effect that was still observable when the treatment was combined with AZD5363. In both cell lines, the combination therapy proved capable of reducing XIAP expression, as well as robustly reducing Erk activation. Interestingly, A2780CP displayed increased Bax and reduced BCL-2, while the same treatment induced only a downregulation of BCL-2 in ECC-1 cells. Finally, in both cases, the concomitant treatment of the cells with both an inhibitor and a cytotoxic compound allowed an almost complete abrogation of MCL-1 protein levels. We then sought to determine the effect of the treatments on two well characterized transcription factor acting as tumor suppressors, FOXO1 and p53 (Fig. 5.4B). In both cell lines, FOXO1 is completely absent of the nuclear compartment in control setting; this is reversed upon single therapy using AZD5363, which allows nuclear localization and protein stabilization. A similar effect can be observed with p53, which is present at low level in the nuclear, as well as cytoplasmic, compartment; however, treatment with AZD5363 allow nuclear accumulation of the protein. In the case of FOXO1, doxorubicin has no noticeable effects on protein localization; p53, however, localizes to the nucleus in A2780CP cells upon doxorubicin treatment, an effect that is not apparent in ECC-1. Finally, the combined treatment allow maximal nuclear localization of both p53 and FOXO1 in A2780CP as well as ECC-1, underlining the ability of this therapeutic strategy to modulate tumor suppressing transcription factor translocalisation and potential activation.

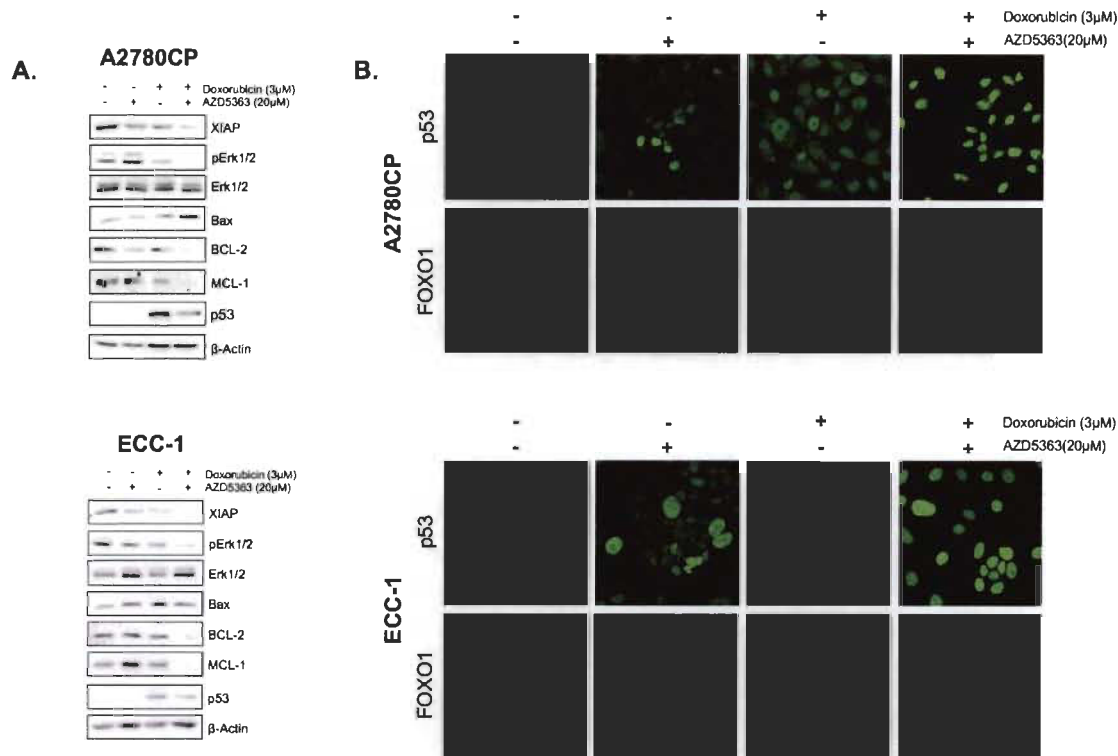


Figure 5.4 **Combination of AZD5363 with doxorubicin regulates key pro-apoptotic signaling pathways.**

A. Cell lines were treated with either doxorubicin (3 μ M), AZD5363(20 μ M) or a combination of both for 24h. Western blot was performed using relevant antibodies and β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments **B.** Immunofluorescence experiments were conducted in order to determine the effect of the previous treatments on p53 and FOXO1 subcellular localization.

Combination of AZD5363 and doxorubicin significantly decreases tumor cells ability to replicate clonally

In order to inquire the long-term effect of the previously demonstrated synergism between LMB and TRAIL on cell viability and induction of apoptosis, we performed clonogenic assays, which allows a more translatable measure of the effect of the combined treatment on tumor progression. Additionally, we believe that clonogenic assays grant us the ability to measure with more validity the effect of longer term, lower concentration treatments on studied cancer cells population in order to emulate more relevantly the clinical context in which the treatment would be used. Preliminary experiments suggested

that AZD5363, when used singly, was incapable of reducing cell viability by 50%, except in the case of ECC-1 where the IC₅₀ was found to be ~10 μ M. Using non-linear regression, we measured the IC₅₀ of doxorubicin in all four cell lines; the obtained results are recapitulated in table 1 (Fig. 5.5A). Unsurprisingly, ECC-1 and A2780CP cell lines were most resistant to doxorubicin when used singly. We then combined 5 μ M of AZD5363, a dose that we had shown earlier to be effective in abrogating multiple signaling pathways as well as being incapable, as shown previously, to reach IC₅₀. The obtained results clearly demonstrate the powerful capabilities of AZD5363 in sensitizing even the most resistant cell lines to doxorubicin, as shown by the stark change displayed in dose response curves as well as IC₅₀, which can be found in table 1 (Fig. 5.5B). Overall, our results suggest that AZD5363, when used in combination with doxorubicin, sensitizes cancer cell lines to the latter compound cytotoxic effect, which translates into the excellent ability of the combination therapy to impede cells clonal duplication.

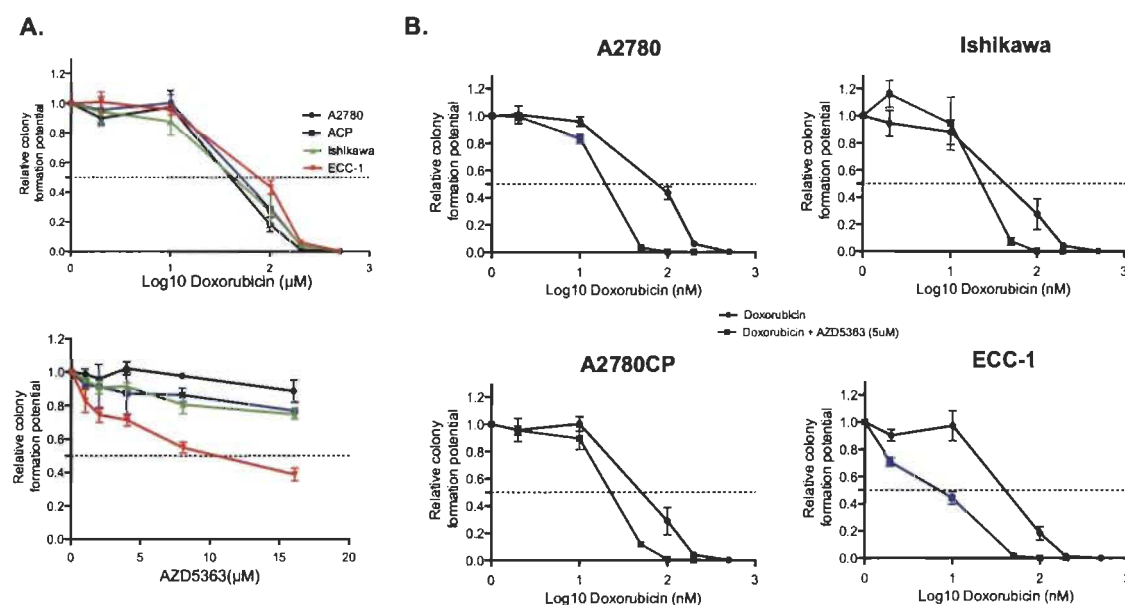


Figure 5.5 **AZD5363 potentiates the ability of doxorubicin to reduce cell proliferation and clonal replication.**

A. Cell lines were treated with increasing concentrations of AZD5363 (0-500nM) or doxorubicin (0-16 μ M). Densitometric analysis were conducted using ColonyArea software. **B.** Cell lines were treated with increasing concentrations of doxorubicin (0-16 μ M) in the presence of AZD5363 (5 μ M). Densitometric analysis were conducted using ColonyArea software. All data are means \pm SEM of three independent experiments. Corresponding calculated IC₅₀ can be found in table 1.

Discussion

The resistance of gynecological cancer to cytotoxic agent is one of the most critical challenge in the treatment of these diseases. Many demonstration points towards the idea that particular pathways, acting as cornerstone of cellular physiology and notwithstanding the presence or absence of mutated nodes within them, could be determinant in the emergence of cancer hallmarks characteristics. We believe that the PI3K/Akt/mTOR pathway, due to its almost singularly central nature, is of the utmost importance in regulating the phenomenon of chemoresistance. It has been well demonstrated that this axis of signaling is critical in cancer establishment, progression and sustainment. In this paper, we have endeavoured to examine whether the combination of a PI3K/mTOR, NVP-BEZ235, or an Akt ATP-competitive inhibitor, AZD5363, could sensitize cancer cells to the cytotoxic activity of cisplatin or doxorubicin.

Interestingly, as shown by figure 5.4A, p53 is enhanced by single agent therapy involving doxorubicin, possibly through intrinsic pathway activation and p53 stabilization; however, maximal nuclear localization can be seen in the context of concomitant therapy, as shown in figure 5.4B. Therefore, we are allowed to think that doxorubicin, by itself, is capable of inducing p53 expression and possibly stabilization; AZD5363, on the other hand, potentiates its action by allowing maximal nuclear localization and, potentially, relieving molecular hindrances limiting p53 activity. Considering that p53 and FOXO1 could potentiate each other transcriptional activity, the concomitant translocation of these two transcription factors is, plausibly, critical to their respective function and allows the observed drug synergism [38, 39]. This experiment demonstrates very simply the idea that single agent therapy could elicit the cellular response, in that case transcription factor nuclear translocation, while being unable to induce apoptosis. The combination of these inhibitors, allowing adequate signaling pathways response, must thus be paired with an apoptotic insult of sufficient potency in order to obtain the antitumoral response that is pursued.

One of the main differences that can be observed between both inhibitor compounds is the inability of NVP-BEZ235 to impede GSK3 β phosphorylation. Considering the

ambiguous role of GSK3 β activity in cancer, the fact that AZD5363 allows sensitization to doxorubicin while relieving GSK3 β of inhibitory post-translational modification allow us to surmise that, in our context, this kinase acts as a tumor suppressor. Experiments conducted in multiple models have shown that GSK3 β can stabilize the β -catenin complex, thus acting as a promoter of dysregulated cell differentiation; GSK3 β could potentially even act as an enabler of chemoresistance, and its overexpression has been reported as a driver of drug resistance in some ovarian cancer samples [40, 41]. It is plausible that multiple axis of regulation impacts GSK3 β in our models; as such, more work is necessary to fully decipher the canvas of post-translational modifications affecting this complex kinase, allowing its oscillation between tumor suppressor and oncogene. Alternatively, it is also well recognized that inhibitors of upstream pathways, such as PI3K inhibitors, generally allow cross-talk compensation with various pathways, mainly the MAPK/Erk pathway [42, 43]. We are allowed to think, considering the cardinal necessity of cancer cells to regulate their homeostatic capabilities, that the inhibition of one of the most central pathway allowing their survival and proliferation would provoke the activation of parallel pathways in order to prevent cell suicide. In that case, the use of PI3K inhibitors would have the unwanted effect of stimulating alternate pathway, an effect that would be mitigated in the case of AZD5363, which disables solely Akt signaling, possibly preventing unwanted balancing effects. Also, the failure of NVP-BEZ235 to inhibit BAD phosphorylation, one of the most striking effects of AZD5363, could explain the higher efficacy of the latter in inducing apoptosis, especially considering that abnormal Akt activation, and thus substrates phosphorylation, is one of the most well recognized molecular process of chemoresistance [2, 4, 44, 45]. Alternatively, as seen in Fig. 5.3A, some level of cleaved caspase-3 can be observed without an increase in PARP cleavage; it is highly plausible that the combination of NVP-BEZ235 and cisplatin is capable of activating the intrinsic pathway of apoptosis but fails to reduce downstream inhibitors of apoptosis such as XIAP, which could explain this discrepancy.

Of course, the nature of the mechanisms allowing a seemingly preferentially effective combination of NVP-BEZ235 with cisplatin and AZD5363 with doxorubicin will require further experiments to fully elucidate. The underlying mechanism of action

of doxorubicin, which does not solely damage DNA through intercalation but also disrupts topoisomerase, could partially explain this difference [46]. Truthfully, however, the lack of fundamental understanding pertaining to the mechanism of action of both of these drugs severely limits our ability to explain this difference; further experiments are required to fully characterize the molecular events driving the synergistically tumoricidal effect that we have described. There is also the distinct possibility that AZD5363, being an Akt isoforms and being capable of inhibiting p70S6K, does not induce transactivation of parallel signaling pathways that would impede chemoresistance; if cisplatin activates these same pathways, the kinase-specific activity of AZD5363 could be partially lost, an effect that could be mitigated by doxorubicin's different mechanism of action and separate resistance mechanisms [47]. Finally, while some data have shown that PI3K/Akt inhibitors are generally display enhanced effectiveness in the case of PTEN-mutated cell lines, our results suggest that the combination of such an inhibitor with a well-suited cytotoxic compound could alleviate these limitations; further experiments will have to be conducted in order to characterize more completely the parameters that circumscribe the effectiveness of this approach.

Conclusion

Overall, we believe that the administration of Akt inhibitors such as AZD5363 allows the robust sensitization of gynecological cancer cell lines to doxorubicin, removing molecular roadblocks that would impede the induction of apoptosis. This combinatorial therapeutic strategy, which allows the upregulation of crucial pro-apoptotic proteins with the coordinated downregulation of anti-apoptotic regulators, could be used to potentiate the treatments currently used in the clinic.

Declarations

The authors have no competing interests to disclose

Funding

This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (238501-01).

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: FF SP EA. Performed the experiments: FF PA KV FD DGC MM. Analyzed the data: FF. Contributed reagents/materials/analysis tools: EA. Wrote the paper: FF EA.

References

1. Bailey, M.H., et al., *Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations*. Cell, 2018. **173**(2): p. 371-385 e18.
2. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
3. Tsherniak, A., et al., *Defining a Cancer Dependency Map*. Cell, 2017. **170**(3): p. 564-576 e16.
4. Gagnon, V., et al., *AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(3): p. 785-95.
5. Kim, D., et al., *AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 975-87.
6. Huang, W.C. and M.C. Hung, *Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance*. J Formos Med Assoc, 2009. **108**(3): p. 180-94.
7. Girouard, J., et al., *Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells*. Gynecologic oncology, 2013. **128**(2): p. 335-343.
8. St-Germain, M.-E., et al., *Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells*. International journal of oncology, 2004. **24**(5): p. 1311-1324.
9. Abedini, M.R., et al., *Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein*. Oncogene, 2010. **29**(1): p. 11-25.

10. Terakawa, N., Y. Kanamori, and S. Yoshida, *Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2003. **10**(2): p. 203-8.
11. Li, X., et al., *Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(5): p. R589-97.
12. Colombo, P.E., et al., *Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014. **89**(2): p. 207-16.
13. Cornelison, R., D.C. Llaneza, and C.N. Landen, *Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
14. Muss, H.B., *Chemotherapy of metastatic endometrial cancer*. *Semin Oncol*, 1994. **21**(1): p. 107-13.
15. Humber, C.E., et al., *Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(3): p. 409-20.
16. Tejerizo-Garcia, A., et al., *Overall survival and disease-free survival in endometrial cancer: prognostic factors in 276 patients*. *Onco Targets Ther*, 2013. **9**: p. 1305-13.
17. Plataniotis, G., M. Castiglione, and E.G.W. Group, *Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Annals of Oncology*, 2010. **21**(suppl_5): p. v41-v45.
18. Robbins, J.R., et al., *Is time to recurrence after hysterectomy predictive of survival in patients with early stage endometrial carcinoma?* *Gynecol Oncol*, 2012. **127**(1): p. 38-42.
19. Odagiri, T., et al., *Multivariate survival analysis of the patients with recurrent endometrial cancer*. *J Gynecol Oncol*, 2011. **22**(1): p. 3-8.
20. Zhao, W., Y. Qiu, and D. Kong, *Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy*. *Acta Pharm Sin B*, 2017. **7**(1): p. 27-37.
21. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(7): p. 5241-8.

22. Powis, G., et al., *Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase*. Cancer Res, 1994. **54**(9): p. 2419-23.
23. Maira, S.M., et al., *Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1851-63.
24. Davies, B.R., et al., *Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(4): p. 873-87.
25. Guzman, C., et al., *ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92444.
26. Maurer, U., et al., *GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 7): p. 1369-78.
27. Liu, W., et al., *[Correlations between the p-Akt-mTOR-p70S6K pathway and clinicopathological features or chemoresistance of ovarian cancer]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2017. **42**(8): p. 882-888.
28. Weng, Q.P., et al., *Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 16621-9.
29. Sridharan, S. and A. Basu, *S6 kinase 2 promotes breast cancer cell survival via Akt*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2590-9.
30. Ruvinsky, I. and O. Meyuhas, *Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(6): p. 342-8.
31. Choi, A.R., et al., *Co-treatment of LY294002 or MK-2206 with AZD5363 Attenuates AZD5363-induced Increase in the Level of Phosphorylated AKT*. Anticancer Res, 2016. **36**(11): p. 5849-5858.
32. Zhang, Y., et al., *A novel AKT inhibitor, AZD5363, inhibits phosphorylation of AKT downstream molecules, and activates phosphorylation of mTOR and SMG-1 dependent on the liver cancer cell type*. Oncol Lett, 2016. **11**(3): p. 1685-1692.
33. Brasseur, K., et al., *Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells*. Oncotarget, 2016.

34. Jebahi, A., et al., *PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 decreases Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies, provided that Bim expression is induced*. Cancer Lett, 2014. **348**(1-2): p. 38-49.
35. Shoji, K., et al., *Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37431.
36. Ishikawa, C., M. Senba, and N. Mori, *Effects of NVP-BEZ235, a dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, on HTLV-1-infected T-cell lines*. Oncol Lett, 2018. **15**(4): p. 5311-5317.
37. Kharma, B., et al., *Utilization of genomic signatures to identify high-efficacy candidate drugs for chemorefractory endometrial cancers*. Int J Cancer, 2013. **133**(9): p. 2234-44.
38. You, H. and T.W. Mak, *Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors*. Cell Cycle, 2005. **4**(1): p. 37-8.
39. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1978-86.
40. Luo, J., *Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy*. Cancer Lett, 2009. **273**(2): p. 194-200.
41. Hilliard, T.S., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta inhibitors induce apoptosis in ovarian cancer cells and inhibit in-vivo tumor growth*. Anticancer Drugs, 2011. **22**(10): p. 978-85.
42. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 320-8.
43. Aksamitiene, E., A. Kiyatkin, and B.N. Kholodenko, *Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(1): p. 139-46.
44. Xie, C., et al., *Retinoblastoma cells activate the AKT pathway and are vulnerable to the PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235*. Oncotarget, 2017. **8**(24): p. 38084-38098.
45. Martini, M., et al., *PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review*. Annals of medicine, 2014. **46**(6): p. 372-383.
46. Nitiss, J.L., *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 338-50.

47. Sherman-Baust, C.A., et al., *Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin.* J Ovarian Res, 2011. **4**(1): p. 21.

Tables

	A2780	A2780CP	Ishikawa	ECC-1
Monotherapy (nM)	35.4	72.98	60.17	90.03
Combined therapy (nM)	6.065	29.09	26.03	22.3

Table 1: Doxorubicin IC50

Supplementary figures

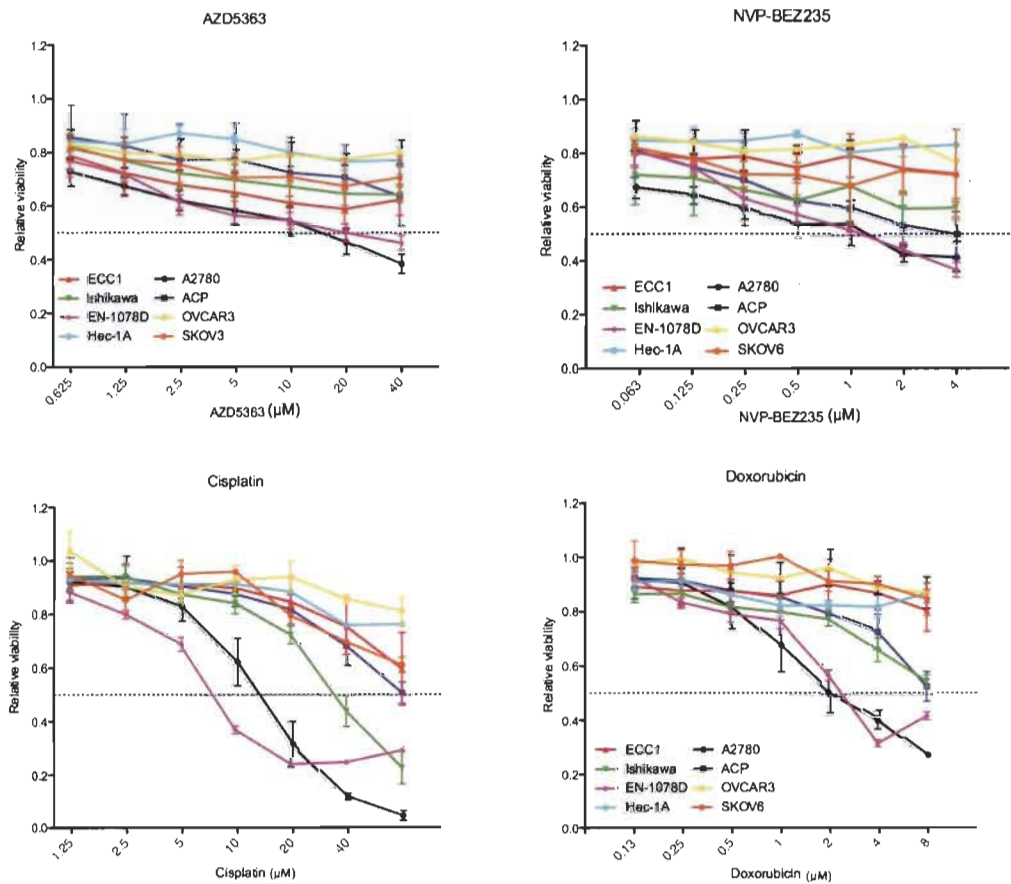


Figure 5.6 Effects of single agent therapy on gynecological cancer cell lines
A. Cell lines were treated with increasing concentration of cisplatin (0-80 μM), doxorubicin (0-8 μM), AZD5363(0-40 μM) or NVP-BEZ-235(0-

4μM) for 24h. MTT assays were then used to determine changes in cell viability. All data are means ± SEM of three independent experiments.

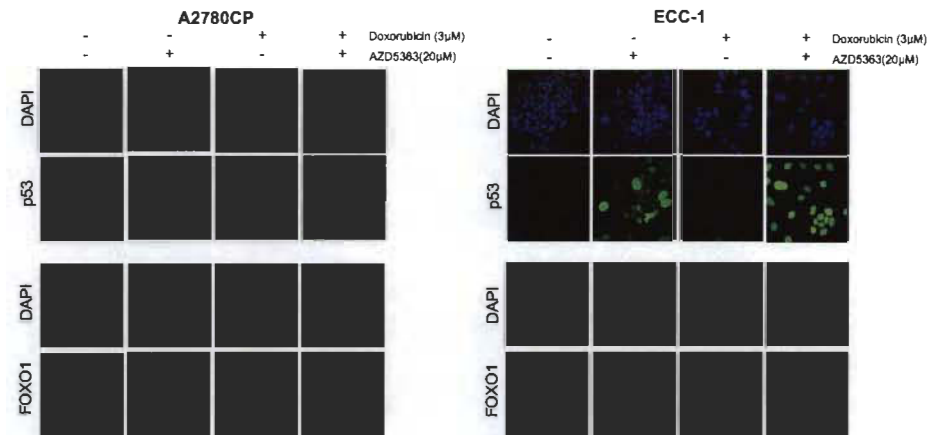


Figure 5.7 Immunofluorescences showing nuclear morphology. Supplementary images to Figure 4B.

CHAPITRE VI

DISCUSSION ET CONCLUSION

6.1 Limitations méthodologiques implicites

La somme des résultats obtenus lors de nos divers projets expérimentaux souligne bien le rôle des voies de signalisation étudiées dans l'homéostasie des tissus gynécologiques, autant au niveau des processus physiologiques, tels que la décidualisation, que des processus pathologiques, tels que la chimiorésistance et la transformation phénotypique. Toutefois, à la suite de ces observations et en concertant toutes les données obtenues, plusieurs questions émergent et subsistent. Notre travail aura permis de clarifier certains processus moléculaires et d'en caractériser d'autres; dans le cas de la chimiorésistance, particulièrement, nos données observationnelles sont à la fois descriptives et corrélatives, sans permettre l'établissement de mécanismes causatifs clairs. C'est là une limitation de notre travail qu'il semble cardinal de souligner, dans la mesure où nous croyons juste de signifier à nouveau que la pertinence de ce même travail n'est pas remise en cause. En effet, l'établissement d'un cadre de référence quant à la réponse moléculaire et physiologique de nos modèles expérimentaux, cadre que nous considérons approfondi et appuyé sur des données probantes et des hypothèses élaborées grâce à des consensus mécanistiques, reste absolument crucial dans l'élaboration d'expérimentations à conception méthodologique plus spécifiques permettant l'émergence de liens causatifs robustes. De plus, considérant que l'étude d'un modèle biologique aussi complexe que l'être humain nécessite certains degrés d'abstractions qui créent une distance épistémologique permettant l'établissement de systèmes expérimentaux hautement contrôlés à validité interne élevée au profit d'une validité externe évidemment diminuée; de ce fait, les résultats obtenus grâce aux lignées cellulaires présenteront toujours certaines limitations et demanderont confirmation dans le contexte de modèles expérimentaux plus complexes, comme l'animal. Dans tous les cas, nous croyons que nos résultats paveront la voie à des études ciblant certains mécanismes déjà connus comme cruciaux dans le destin cellulaire et nouvellement identifiés comme modulés dans notre contexte

expérimental; de plus, nous proposons des avenues par lesquelles nos résultats pourront être confirmés, autant dans des modèles murins que dans des modèles cellulaires faisant usage de stratégie permettant l'identification de liens causatifs, afin d'évaluer ladite validité externe et l'applicabilité clinique de nos résultats. Cette discussion sera donc organisée autour de ces thèmes, à savoir de traiter de certaines questions laissées ouvertes par nos expériences et des propositions d'expériences futures permettant de cimenter nos résultats.

6.2 Les isoformes d'Akt dans le contrôle du processus de décidualisation

Tout d'abord, le rôle d'Akt dans la décidualisation, particulièrement le rôle des isoformes 1 et 2, nous apparaît comme clair. Nos résultats montrent que les isoformes 1 et 2 d'Akt, lorsque myristoylés, s'opposent à l'induction de la décidualisation, une conclusion suggérée par la diminution significative de l'expression d'IGFBP1 et de PRL lors de la surexpression de ces deux protéines. La cible la plus probable de cet effet d'antagonisme fonctionnel est FOXO1, qui, lorsque phosphorylé, perd la capacité de se localiser au niveau nucléaire. Tel que présenté dans l'introduction, cette localisation est cruciale à l'accomplissement du programme décidual et à la transcription des gènes cibles permettant la transformation phénotypique et génétique caractérisant ce processus. De façon intéressante, si l'effet principal de l'expression et l'activation de ces deux isoformes étaient bien la phosphorylation aberrante de FOXO1 et sa rétention cytoplasmique, cela impliquerait que Akt3 n'aurait pas la capacité de phosphoryler FOXO1, une disparité fonctionnelle fort intéressante. En effet, il aurait été acceptable de supposer que la localisation subcellulaire différentielle des isoformes aurait pu limiter leurs accès respectifs à divers substrats, ce qui pourrait être un mécanisme permettant leur spécificité de substrats et fonctionnelle en découlant.

Il semble pertinent de discuter au passage de certaines zones grises perdurant dans la modélisation mécanistique de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. Spécifiquement, dans le cas du modèle de myristoylation, le mécanisme exact d'activation constitutive de la protéine n'est étrangement pas entièrement clarifié; les données ayant servi à son

élaboration sont anciennes et précèdent notre compréhension complète du recrutement d'Akt par son domaine PH et le rôle de PI3K dans cette activation [391-393]. Les auteurs suggéraient déjà, à l'époque, que l'ajout d'un motif à la protéine pourrait provoquer un changement conformationnel; il semble peu plausible que ce soit le cas directement, mais il serait possible de croire que la myristoylation d'Akt change la dynamique d'activation de la protéine, permettant l'activation PIP₃ indépendante de la protéine non seulement par ancrage dans la bicouche lipidique, mais aussi par modulation allostérique favorisant l'activation de la kinase par mTORC2, inconnu à l'époque. Qui plus est, des expériences utilisant Akt^{myr} ont montré que l'abrogation de la capacité d'Akt à lier l'ATP, en plus de la mutation de son site de phosphorylation en thréonine 308, ne limite pas sa phosphorylation en sérine 473 [121]. Cette disjonction complète entre la phosphorylation du résidu thréonine et sérine révèle soit une indépendance post-traductionnelle, indépendance qui va partiellement à l'encontre du dogme classique d'activation d'Akt, soit révèle que la myristoylation modifie fondamentalement les paramètres entourant la dynamique enzymatique de la kinase. Certains chercheurs ont proposé que la localisation membranaire d'Akt permette son interaction avec une forme constitutivement active de mTORC2, ce qui expliquerait la place accessoire de PI3K dans ce modèle d'activation. PI3K aurait donc, dans ce contexte, la fonction de permettre la modification allostérique d'Akt mais aussi comme fonction secondaire de permettre la localisation prescrite pour la phosphorylation de la kinase ainsi que l'activation de la sous-population de mTORC2 dont l'activation est dépendante de PI3K via la phosphorylation de mSin par Akt [107, 394]. D'autre part, ces mêmes auteurs ont montré que le PIP₃, via son phosphate 3' et indépendamment du phosphate 5', permettait une modification allostérique d'Akt augmentant son affinité pour ses substrats. Ces résultats nouveaux viennent consolider la démonstration classique supportant que la liaison d'Akt au PIP₃ provoque un changement conformationnel nécessaire à son activation, tout en montrant l'importance des réserves de PIP₂ présentes dans les endomembranes [395]. En cohérence avec la modélisation suggérée en introduction, une population de mTORC2 serait donc localisée à la membrane plasmique alors qu'une autre, dont l'activité dépendrait potentiellement de PI3K et dont la localisation serait régie par le domaine PH de la sous-unité mSin, serait localisée aux membranes endosomales; ces deux populations pourraient activer préférentiellement

certaines isoformes d'Akt, en fonction de leur affinité respective et de leurs partenaires protéiques. Par exemple, considérant qu'une population de mTORC2 dépendantes de PI3K semble exister à la surface des mitochondries, il semble permis que des isoformes d'Akt spécifiques pourraient, en fonction de leur domaine PH distincts, s'amonceler autour de ces mêmes organelles et activer cette population particulière mTORC2. Or, plusieurs démonstrations montrent que Akt2 semble se localiser et s'enrichir préférentiellement au niveau mitochondrial en réponse à l'insuline et divers autres facteurs de croissances [396-398]. Qui plus est, des expériences conduites dans des cellules double knockout pour Akt1 et Akt2 et dans lequel les auteurs réintégraient des isoformes modifiés ont démontrées que la substitution du site PH d'Akt1 par celui d'Akt2 induisait un ralentissement significatif de la progression dans le cycle cellulaire via une perte de l'accumulation de la cycline D1, effet non-observable lorsque le domaine PH d'Akt2 était substitué par celui d'Akt2 [399]. Ces résultats suggèrent que c'est le domaine PH d'Akt1 qui permet l'expression normale de la cycline D1, et que son unique présence est suffisante, nonobstant des autres différences existant entre Akt1 ou Akt2, pour activer les voies de signalisation propre à Akt1. Ces résultats soulignent le rôle absolument charnière du domaine PH dans la sélection des substrats, bien plus prononcés que le domaine kinase si souvent montré du doigt pour expliquer les spécificités fonctionnelles de chaque isoformes. La même étude rapporte une augmentation modeste de la phosphorylation d'Akt2 sur sa sérine 473 en comparaison de la phosphorylation observable sur Akt1. Cette différence s'efface lorsque le domaine PH d'Akt2 est remplacé par celui d'Akt1. En concordance avec l'hypothèse que des populations distinctes de mTORC2 existent au sein de la cellule, on peut penser que la fonction primaire de mTORC2 mitochondrial ne serait donc pas de phosphoryler directement Akt2, mais que ce serait bien plutôt Akt2 qui agirait comme activateur primordial de mTORC2 qui lui-même phosphoryle par la suite des cibles qui permettent la régulation normale de la réponse à l'insuline et au métabolisme du glucose. En accord avec cette hypothèse, les souris knockout pour Akt2 présentent un phénotype diabétique, soulignant plausiblement le rôle crucial d'Akt2 dans le métabolisme du glucose, tout à fait en phase avec sa localisation mitochondriale préférentielle [400]. Lorsque cette information est assemblée, il semble possible de croire que grâce à leurs domaines PH distincts, chaque isoformes se localisera à la surface de

certaines membranes plasmiques, endosomales ou mitochondriales, et ce, via l'interaction avec un bassin de PIP particulier; ce dernier aura aussi la capacité de recruter de façon concomitante une population de mTORC2 spécifique, qui nécessitera ou non un relâchement allostérique permis par la kinase Akt maintenant partiellement activée. On peut aussi croire que par la suite, mTORC2 phosphorylera ce même isoforme fortement ou faiblement sur sa sérine 473, et que cet isoforme, ainsi que le mTORC2 maintenant activé par la phosphorylation obtenue sur mSin, agira directement ou indirectement sur des voies de signalisation en aval. De cette réflexion émerge une conclusion qui permettra d'orienter les expériences futures et précisera en partie une hypothèse à explorer futurément. Prenons d'abord en compte la localisation différentielle d'Akt1 et Akt2, en regard de leurs mécanismes de régulation et leur place tout à fait divergentes dans la physiologie cellulaire. Considérons ensuite que la myristoylation provoque potentiellement une localisation partiellement artefactuelle d'Akt2 à la membrane plasmique, une situation qui s'apparente aux expériences démontrant que la présence du domaine PH d'Akt1 sur Akt2 suffit à rescaper le phénotype de knockout d'Akt1. Ensemble, ces informations permettent de croire que la kinase Akt1 est celle responsable de l'inhibition de l'induction de la décidualisation. L'effet réel d'Akt2 devra être confirmé en utilisant d'un modèle non-myristoylé qui permettra la localisation physiologique d'Akt2 et ainsi assuré que l'imbriquement dans la membrane plasmique de la kinase n'occasionnera pas une activité mimétique d'Akt1 par positionnement et par interaction avec une classe spécifique de mTORC2 PI3K-indépendant. Finalement, la non-opposition de la décidualisation par l'expression d'Akt3 myristoylé peut s'expliquer par plusieurs paramètres. D'une part, les niveaux d'expression les plus élevés d'Akt3 se retrouvent au niveau cérébral; l'importance de cet isoforme dans le développement nerveux est soulignée par la réduction de la masse encéphalique dans les souris knockout pour cet isoforme [331, 401]. Akt3 semble, de surcroît, être régulé de façon tout à fait opposée à ses isoenzymes dans le contexte du tissu cérébral. En effet, des résultats ont montré que la double phosphorylation d'Akt3, ainsi que l'activation de mTORC2, avait un effet négatif sur la phosphorylation de GSK3B, en plus de diminuer la régénération axonique [402]; ces résultats sont évidemment contraires à ceux attendus selon le modèle classique de l'axe PI3K/Akt/mTOR. Finalement, la majorité des données obtenues à ce jour, en

incluant les nôtres (Fig. 6.1), suggère qu'Akt3 serait principalement nucléaire; son déplacement cytoplasmique serait même corrélé à une augmentation en grade des cancers, soulignant l'anormalité de cette translocation.

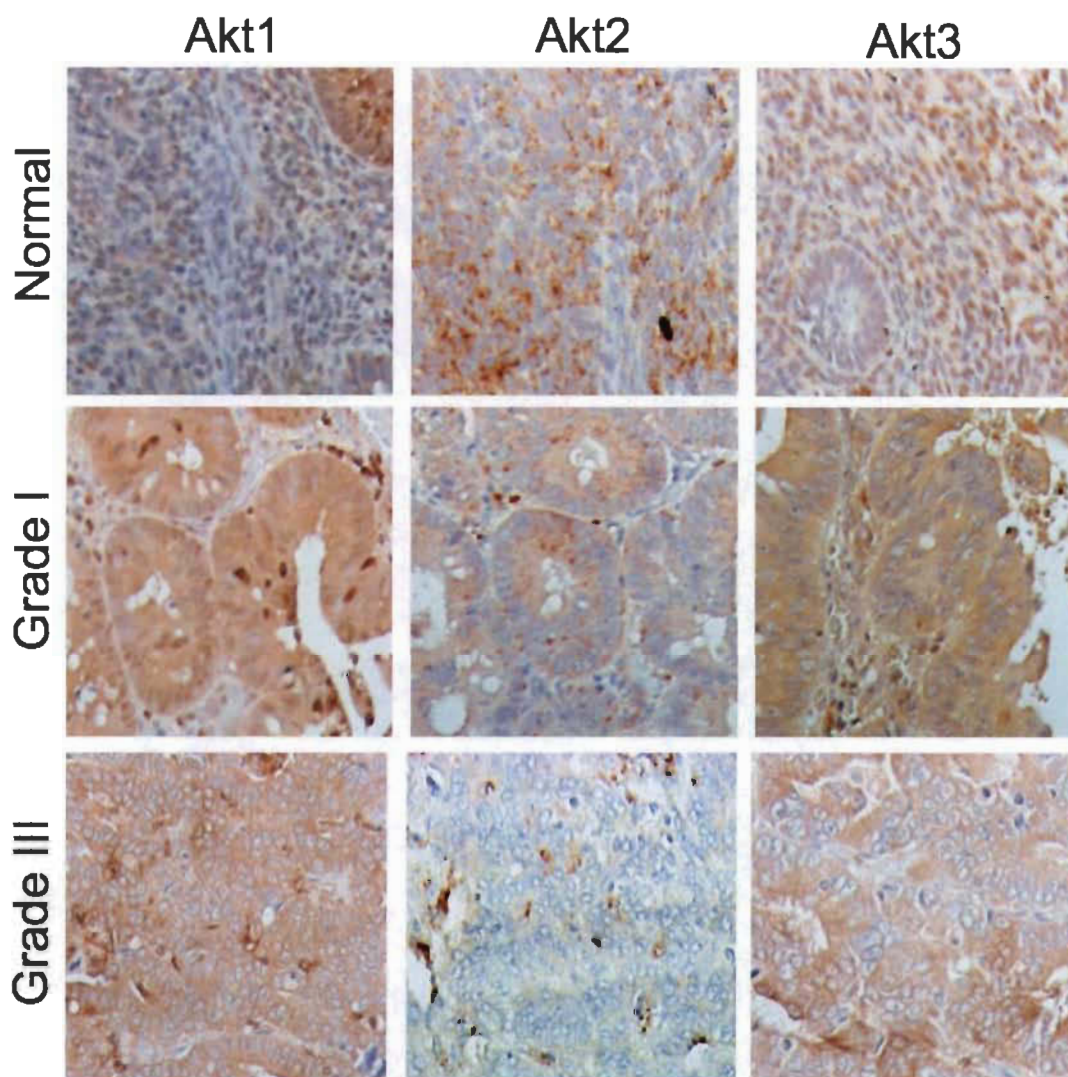


Figure 6.1 Localisation intracellulaire des isoformes d'Akt en fonction du grade tumoral

Immunohistochimie d'Akt1, Akt2 and Akt3 sur une micropuce tissulaire de carcinomes endométriaux. On observe dans le cas du cancer de grade I la délocalisation de Akt3, principalement nucléaire dans les tissus normaux, vers le cytosol. Au contraire, dans le cas de Akt1, la localisation principalement cytoplasmique dans le tissu normal est remplacée par une localisation cytonucléaire dans le cas du cancer de grade I. Akt2, dans le tissu normal, semble localisé dans des foci qui s'apparentent aux mitochondries; cette localisation devient entièrement cytoplasmique, sans enrichissement ponctuel, dans le cas du cancer de

grade I. Finalement le cancer avancé de grade III présente un marquage cytoplasmique pour les trois isoformes, soulignant le changement de localisation des isoformes d'Akt en fonction de l'état de transformation oncogénique. Grossissement de 670X.

L'absence quasi-totale d'outils valides permettant l'observation et la mesure d'activité enzymatique intracellulaire limite notre compréhension de ce phénomène pourtant d'une importance souveraine dans la biologie cellulaire. L'équipe de Ebner et collègues sont, en ce sens, des pionniers dont le travail ne saurait être trop félicité, principalement en regard des techniques raffinées qu'ils auront développées afin d'élucider les complexes processus mécanistiques entourant l'amarrage et l'activation de mTORC2 et Akt au sein de la cellule [107, 394]. D'un autre côté, très peu d'information est disponible quant à la localisation intracellulaire d'Akt myristoylé, si ce n'est que la protéine se localise à la membrane plasmique indépendamment de l'activité de PI3K; s'il s'avérait que Akt^{myr} s'imbrique et s'ancre dans la membrane plasmique et soit incapable de se localiser sur les feuillettes lipidiques internes de la cellule, tel que les endosomes, il est fort possible que son incapacité d'interagir avec la population de mTORC2 PI3K-dépendante modifie complètement la réponse cellulaire obtenue dans les modèles utilisant cette construction. Ces limitations doivent être prises en considération lors de l'analyse de nos résultats, mais soulignent surtout l'incomplétude surprenante de nos modèles explicatifs concernant l'axe PI3K/Akt/mTOR.

Une autre question subsiste quant à la diminution des niveaux protéiques d'Akt, et ce, principalement dans le cas de l'isoforme 1. Nos résultats suggèrent que cette diminution n'est pas dépendante du protéasome ni d'une modulation transcriptionnelle. Notre hypothèse principale pour expliquer ce phénomène serait qu'une régulation de miRNA permettrait de diminuer la traduction des ARNm des isoformes d'Akt diminués, sans pour autant provoquer leur dégradation. Les microARNs (miRNAs) sont de petits ARN non-codants de 21 à 22 nucléotides retrouvés dans la majorité des eukaryotes. Ils font partie de la famille des ARN interférents, ce qui indique leur capacité de moduler négativement la traduction d'ARN cibles, contrôlant ainsi l'expression de certains gènes [403]. Les miRNAs sont présents autant de façon intergénique (classiques) qu'intronic

(Mirtrons). Les miRNAs sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II, ce qui génère une séquence nucléotidique en tête d'épingle, affublée d'une coiffe 5' et d'une queue polyA, qu'on nomme le pri-miRNA. Ce dernier sera par la suite reconnu par le complexe DGCR8/Drosha qui viendra cliver le pri-miRNA, ne laissant que la séquence en tête d'épingle. Le clivage effectué, le pri-miRNA, maintenant pre-miRNA, sera exporté vers le cytoplasme par Exportin-5 [403-405]. C'est dans ce compartiment que s'amorceront les dernières étapes de maturation du miRNA; Dicer, une RNase de type III, sera recrutée par TRBP [406] et clivera la boucle unissant les deux brins d'ARN, donnant naissance à un duplex de miRNAs de séquences complémentaires. L'un des deux brins sera par la suite intégré dans le *RNA-induced silencing complex* (RISC) au sein duquel il agira à titre de patron pour diriger l'action spécifique du RISC. En effet, la séquence du miRNA maintenant chargé dans le RISC sera complémentaire à la séquence 3'-UTR de son gène cible; une fois l'appariement complété, le RISC pourra moduler l'expression de l'ARNm grâce à deux mécanismes principaux. Le premier tient dans le clivage direct de l'ARNm via une protéine de la famille des Argonautes, membre charnière du RISC, présentant une activité *slicer*. Ce mécanisme nécessite une complémentarité presque parfaite entre le miRNA guide et sa cible [404, 407]. Le second mécanisme implique la répression traductionnelle de l'ARNm via son transport vers les p-bodies, site de stockage, de décoiffage et de déadenylation des ARNm, ce qui déstabilisera l'ARNm et mènera à sa destruction éventuelle [408] (Fig. 6.2).

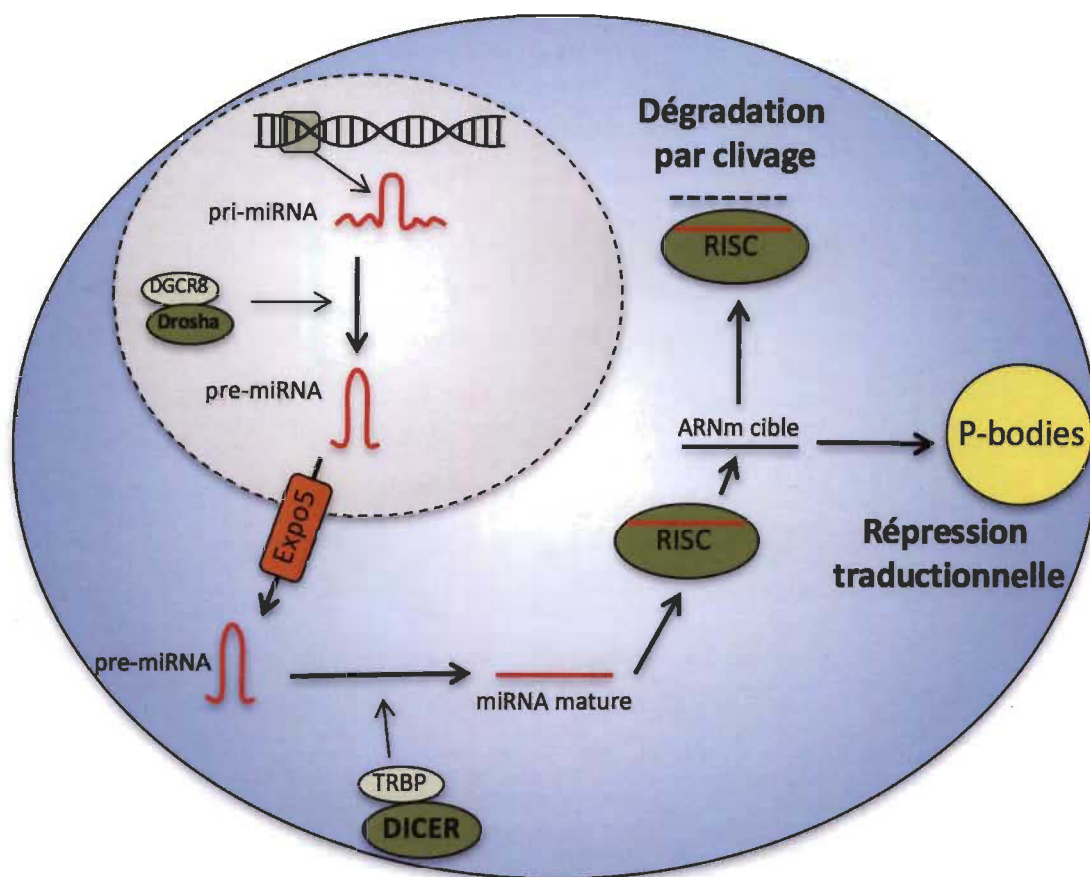


Figure 6.2 Récapitulation schématique des voies de signalisation associée à la biosynthèse de microARN

Comme nos résultats semblent montrer une absence de changement au niveau des populations d'ARNm disponibles dans la cellule, il est fort plausible que ce deuxième mécanisme soit impliqué. Une hybridation in-situ permettrait de localiser nos ARNm et un comarquage avec GW182, protéine essentielle à l'assemblage du complexe permettant la régulation faite par les miRNA, confirmerait cette localisation [409]. De plus, dans le contexte de la décidualisation humaine, des expériences ont montré que la protéine Dicer ne serait pas cruciale à la biosynthèse des miRNA, suggérant l'existence d'une voie de biosynthèse alternative [410]. Il semble important de mentionner que d'autres mécanismes de répression traductionnelle existent, par exemple l'inhibition de l'interaction entre l'ARNm et le complexe d'initiation eIF4F, inhibant ainsi l'initiation de la traduction. Au contraire de la dégradation directe, ces mécanismes nécessitent une faible complémentarité entre le miRNA guide et sa cible. On pourrait aussi attribuer nos résultats à ce mécanisme étant donné la non-diminution de l'ARNm des isoformes d'Akt lors de la

décidualisation; toutefois, l'absence de dégradation supporte mal cette hypothèse compte tenu de la faible stabilité intracellulaire des ARNm non-appariés. Dans tous les cas, très peu de données sont disponibles quant à l'identité des miRNA qui pourrait contrôler de façon directe la stabilité de l'ARNm d'Akt et son expression subséquente; la majorité des démonstrations on, jusqu'à aujourd'hui, confirmer le rôle central des miRNA dans la régulation de l'activité d'Akt via la modulation de l'expression de ses régulateurs positifs et négatifs [411, 412]. Toutefois, une analyse rapide faite sur Targetscan, un outil d'analyse prédictive de cible de miRNA utilisant la présence de sites hautement conservés en 3'UTR, suggère que près d'une douzaine de miRNA pourraient s'apparier aux ARNm d'Akt1 alors que seulement deux pourraient faire de même avec Akt2; Akt3, pour sa part, posséderait des sites de fixations pour environ une dizaine de miRNA. En somme, des expériences supplémentaires devront être menées afin de valider notre hypothèse selon laquelle la diminution d'Akt lors de la décidualisation provient d'une interférence traductionnelle dû à un stockage des ARNm provoqué par l'expression nouvelle de miRNA spécifique à la transformation déciduale.

6.3 La place sibylline de Par-4 dans l'induction de l'apoptose

En second lieu, les résultats obtenus dans le contexte de nos expériences impliquant Par-4 sont difficiles à expliquer considérant une certaine incohérence avec la littérature disponible. En effet, le rôle de Par-4 ne semble pas limité à une activité purement pro-tumorigène et anti-proliférative. Les données obtenues à travers notre expérimentation impliquant le TGF- β suggèrent que Par-4 agit comme médiateur de la voie de signalisation dépendante des SMAD en permettant la réponse au TGF- β . De plus, non seulement Par-4 semble permettre la transmission du signal mais l'expression de Par-4 elle-même semble partiellement contrôlée par la voie de signalisation SMAD; cette régulation, au finale, semble placer Par-4 dans une position signalétique promouvant l'EMT, un processus habituellement considéré comme soutenant la progression tumorale et permettant l'atteinte de phénotype invasif. Ce résultat semble, de prime abord, en opposition complète avec l'hypothèse que Par-4 agit uniquement comme suppresseur de tumeur. Des résultats récents ont aussi suggéré un rôle prolifératif à Par-4 dans les cellules de leucémie,

des résultats qui invoquent des mécanismes notre manque de compréhension des mécanismes de régulation contrôlant l'activité de Par-4 [413].

Tout d'abord, l'une des informations les plus importantes par rapport à cette dichotomie fonctionnelle tient dans les résultats récemment obtenus par Brasseur et al. [414]; les premières observations qui ont mis en relief le rôle possible d'Akt dans la dynamique de stabilisation de Par-4 ont été faites de façon anecdotique. Alors que des clones d'expressions stables pour Par-4 clivé, produits via sélection de cellules transduites par lentivirus intégrant, des niveaux très limités de transgènes étaient observables. Un travail de caractérisation plus approfondi a permis de démontrer que la voie PI3K/Akt était responsable de cette déstabilisation du fragment clivé surexprimé. En effet, les travaux de Brasseur et al. ont montré que l'activité augmentée d'Akt provoquait une dégradation protéasome dépendante de Par-4, ce qui expliquait l'absence apparente d'expression dans son système de sur-expression [414]. Ces résultats viennent s'ajouter à ceux obtenus par notre équipe montrant que l'utilisation d'une thérapie combinatoire leptomycine B et TRAIL ne semblait pas plus efficace dans ces mêmes lignées surexprimant le fragment clivé de Par-4 (Fig. 6.3).

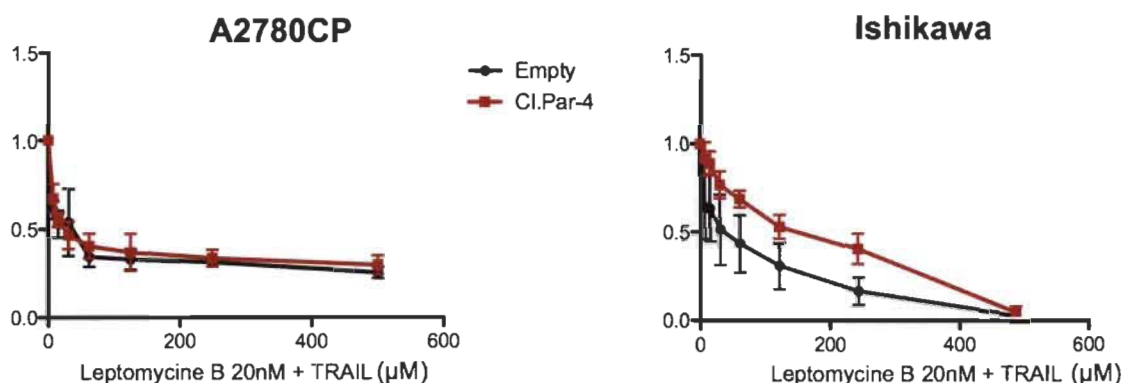


Figure 6.3

Essais MTT en avec leptomycine B et TRAIL à dose croissante

Essais MTT en utilisant des cellules A2780CP et Ishikawa transduite de façon stable avec un vecteur contrôle ou un vecteur permettant la surexpression du fragment clivé de Par-4. Les résultats montrent que la présence du vecteur ne semble pas augmenter l'efficacité de la combinaison de composés. Les cellules ont été produites par Kevin Brasseur.

Il est fort plausible que ces lignées cellulaires, toutes deux présentant des mutations provoquant une suractivation de la voie PI3K/Akt, ne pouvaient stabiliser adéquatement ce fragment clivé sous l'influence délétère continue de l'axe signalétique suractivé. De plus, la littérature rapporte que Akt1, lorsqu'activé, peut phosphoryler Par-4 sur sa sérine 249, provoquant sa rétention cytoplasmique via interaction avec 14-3-3 [385]; il semble important de mentionner que cette sérine, tel qu'indiqué en figure 1.17, est présente sur le fragment clivé de Par-4 tout autant que la forme pleine longueur. L'activité dysrégulée de l'axe PI3K/Akt provoquerait donc non seulement la déstabilisation du fragment clivé de Par-4, un clivage qui apparaît nécessaire afin de potentialiser la capacité de Par-4 à provoquer l'induction de l'apoptose, mais limiterait la capacité de ce même fragment à entrer dans le noyau, une translocalisation qui semblerait nécessaire à l'action tumoricide de Par-4 [383, 384, 389, 415, 416]. De surcroît, dans ce contexte, l'utilisation de leptomycine B ne permettrait pas la localisation nucléaire de Par-4 étant donné que la problématique ne semblerait pas être une extrusion nucléaire anormale de Par-4 mais bien le rôle de certaines modifications post-traductionnelles à entraver son importation. En cohérence avec cette hypothèse, nos résultats préliminaires ont bien montré que la leptomycine B ne permettait pas un enrichissement nucléaire de Par-4 (Fig. 6.4).

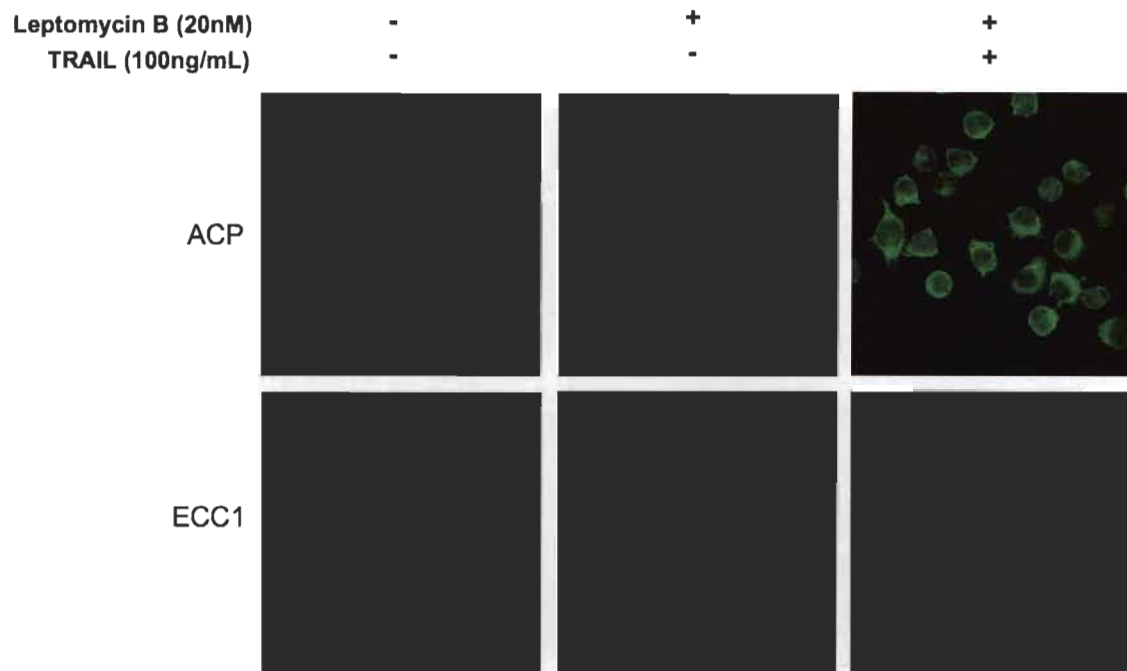


Figure 6.4 Immunofluorescence de Par-4 en présence de leptomycine B et de TRAIL

Immunofluorescence en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre Par-4. L'utilisation de leptomycine B, tout comme de TRAIL, ne permet pas une localisation nucléaire augmentée de Par-4. Il est important de mentionner que l'anticorps ne permet pas de départager la forme pleine longueur de la forme clivée. Grossissement de 400X.

Finalement, les résultats obtenus dans le contexte de notre travail impliquant le TGF- β ont suggéré que XIAP occupait un rôle particulièrement central dans le contrôle de l'effet de Par-4 sur la motilité cellulaire. Il semble plausible de croire que XIAP, de par sa capacité à inhiber le clivage des caspases ainsi que l'activité des caspases exécutrices, pourrait limiter le processus de clivage de Par-4, provoquant un déséquilibre entre les niveaux des deux formes de Par-4. Cette information sous-tend l'idée que dans le contexte gynécologique, Par-4 agirait de façon binaire, la forme pleine longueur ayant comme rôle la modulation de la motilité cellulaire alors que la forme courte provoquerait l'apoptose, tel que le veut le modèle canonique actuel entourant le rôle antitumoral de Par-4. L'absence quasi complète d'expérimentations, hormis celles ayant été conduites dans notre laboratoire, mettant en scène le fragment clivé limite malheureusement notre compréhension de son action exacte. De plus, tel que mentionné dans l'introduction, une multitude d'informations contradictoires s'affrontent dans la littérature, le domaine SAC

étant considéré parfois comme charnière dans la capacité de Par-4 à permettre induction de la mort cellulaire et le domaine leucine zipper étant accessoire à cette activité, et dans d'autres cas le domaine zipper étant considéré comme capital dans l'interaction de Par-4 avec des partenaires protéiques, une interaction supposée nécessaire à cette même activité cytocide. Sa capacité à interagir avec l'ADN n'a pas non plus été confirmée expérimentalement, compliquant encore plus notre tâche d'élucider son action nucléaire. En vue de ces informations, notre hypothèse, qui devra être explorée expérimentalement, est que Par-4 agit au niveau nucléaire comme inducteur de la mort cellulaire via son interaction avec des partenaires protéiques, possiblement en permettant l'érection d'une plateforme signalétique nucléospécifique ou via l'échafaudage d'un complexe transcriptionnel au sein duquel Par-4 occupe un rôle structurant ou adaptateur; ce rôle potentiel apparaît solidifié par la démonstration que Par-4 peut interagir avec la topoisomérase, nonobstant le fait que nous arrivions à une conclusion différente quant au rôle physiologique que cette interaction pourrait occuper [417]. L'incapacité de Par-4 à induire l'apoptose dans le contexte gynécologique émanerait donc, globalement, de son instabilité provoquée par sa dégradation coordonnée par l'axe PI3K/Akt et par sa rétention cytoplasmique induite par la phosphorylation dirigée par Akt. Nous pensons aussi plausible de croire que XIAP, une protéine déjà impliquée dans la chimiorésistance des cancers gynécologiques [280, 418], puisse limiter le clivage de Par-4 ce qui, en concomitance avec les paramètres cités précédemment, dérégulerait les niveaux relatifs de Par-4 pleine longueur et clivés. En considérant ce déséquilibre, la possible homodimérisation de Par-4 avec son fragment clivé pourrait obliger la rétention cytoplasmique de ce dernier, ne serait-ce que par la taille du complexe formé ou bien par encombrement stérique. Il semble possible que des modifications post-traductionnelles distinctes affectent le segment N-terminal de Par-4, tronçon de la protéine perdue lors du clivage, et qui épargneraient normalement le fragment clivé; ces modifications post-traductionnelles non-caractérisées pourraient limiter l'entrée nucléaire de Par-4. Finalement, le domaine SPRY, un motif peptidique D/E-I/L-NNN présent en position N-terminal de Par-4 et permettant l'interaction protéine-protéine, semble un candidat intéressant pour expliquer les problématiques de localisation nucléaire de la protéine [419]. En effet, ce domaine encore excessivement mal caractérisé semble permettre

l'interaction avec les protéines de classe SBSP (SPRY domain- and SOCS box-containing proteins), plausiblement capable d'agir à titre d'ubiquitine ligase E3 [420]. Qui plus est, des travaux, fortement inspirés de nos résultats concernant l'identification du fragment clivé de Par-4, ont montré que le fragment N-terminal produit par le clivage de Par-4, nommée Par-4 Amino-terminal Fragment (PAF), agirait comme inhibiteur de Fbxo45, une protéine potentiellement capable d'ubiquitiner Par-4 [371]; pour ce faire, les auteurs stipulent que le domaine VASA, qui correspond en fait au domaine SPRY, présent en N-terminal pourrait leurrer certaines protéines, prodiguant un effet protecteur au Par-4 encore actif. Il semble important de mentionner au passage que l'ubiquitination, bien que généralement considéré comme une modification post-traductionnelle induisant la dégradation protéique par le protéasome, agit plutôt comme un régulateur central de l'interaction protéine-protéine, et donc, la localisation de ces dernières [421]. Finalement, mentionnons un résultat obtenu par les équipes de Rangnekar et Goswami qui suggérerait que la surexpression du leucine zipper en concomitance avec la surexpression ectopique de Par-4 abrogeait la capacité de ce dernier à sensibiliser les cellules à l'induction de l'apoptose [390]; cette information semble encore pointer vers l'idée que Par-4 aurait la capacité, grâce à son leucine zipper, de se dimériser ou se lier à une protéine inhibitrice, ce qui limiterait sa capacité à agir normalement, plausiblement par la cessation de son importation nucléaire. Ces informations renforcent notre hypothèse selon laquelle le domaine N-terminal de Par-4 pleine longueur pourrait agir négativement à l'endroit de la protéine et, via une dimérisation potentielle, pourrait influencer la capacité de Par-4 clivé à agir de façon cytocide via une séquestration cytoplasmique anormale. Afin de pleinement valider cette hypothèse, il serait attrayant d'utiliser la technique des CRISPR/Cas9 afin de générer des lignées cellulaires n'exprimant pas Par-4; la stratégie moléculaire subséquente serait bipartite. Tout d'abord, nous devons réintégrer des constructions plasmidiques permettant l'expression de protéine Par-4 exhibant diverses mutations; il faudra donc produire soit Par-4 WT, soit une forme de Par-4 présentant un site SPRY muté ou soit une forme de Par-4 au site leucine zipper modifié par remplacement de certaines leucines par des alanines. Le second volet de cette expérience serait l'expression respective de chacun des trois constructions précédentes simultanément avec la transduction d'un plasmide exprimant soit la forme clivée de Par-4 WT, soit la

forme clivée de Par-4 mutée sur son leucine zipper de façon similaire à indiqué précédemment, ces deux protéines étant marquées à l'aide d'une séquence signal His en C-terminal. Une précaution supplémentaire pourrait être prise en générant aussi une protéine Par-4 clivée sans signal drapeau, de façon à permettre la validation de la non-interférence de la séquence His dans l'interaction protéique. Des expériences d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence pourraient être conduites dans le but de caractériser l'interaction potentielle, en plus d'expériences de MTT afin d'évaluer l'effet global de ces mutations sur la capacité de Par-4 à induire une réduction de viabilité cellulaire. D'un point de vue pharmacologique, il serait intéressant d'utiliser des traitements d'AZD5363, de leptomycine B et de cisplatine, singulièrement ou en combinaison, dans le contexte des cellules Par-4 KO/Par-4^{mut} générées dans l'expérience précédente tout comme dans les cellules non-modifiées et déjà utilisées dans nos expériences passées. Ces expériences permettraient d'étudier l'effet d'un inhibiteur d'Akt permettant potentiellement l'accumulation, la stabilisation et l'abrogation de la phosphorylation de Par-4 en sérine 249, la leptomycine B, limitant la potentielle exportation nucléaire de Par-4 rendue possible par un site consensus NES et le cisplatine, stabilisant elle aussi Par-4 et induisant la mort cellulaire par apoptose (Fig. 6.5).

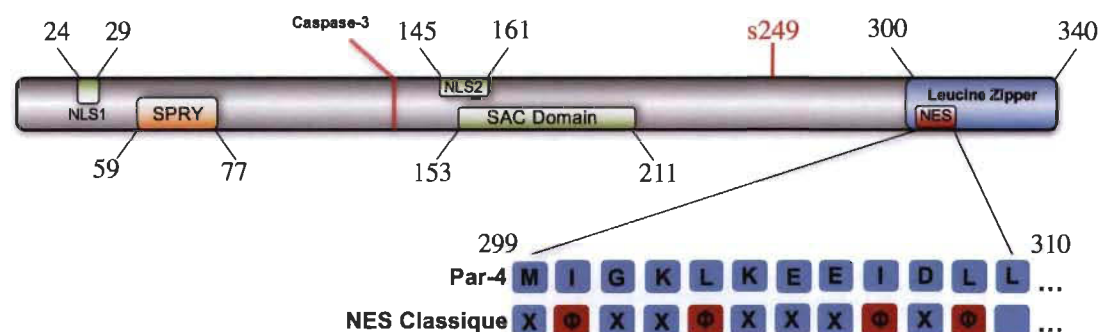


Figure 6.5

Carte schématique de la protéine Par-4

Représentation des divers séquences et domaines présents sur la protéine Par-4 qui pourraient faire l'objet de mutations ou de modification afin de dévoiler les mécanismes de régulation expliquant l'incapacité de Par-4 à induire l'apoptose dans les modèles gynécologiques. Le domaine SPRY, en orange, permet l'interaction protéine-protéine, potentiellement avec la protéine Fbxo45 et SBSP; le site de phosphorylation par Akt1 en sérine 249; le NES potentiel en C-terminal, révélé par l'homologie de séquence consensus des NES.

En ajoutant à ce système les variables expérimentales introduites par nos constructions plasmidiques proposées, nous croyons qu'il serait possible de faire la lumière sur les mécanismes régissant le rôle pro-apoptotique de Par-4 et les paramètres expliquant notre échec actuel à l'instrumentaliser jusqu'à maintenant dans nos modèles cellulaires. Si nous n'arrivions pas à démontrer une dimérisation mais que la mutation du leucine zipper permettait la sensibilisation des cellules à une insulte apoptotique secondaire, il conviendrait de procéder à des expériences de spectrométrie de masse afin d'identifier, une bonne fois pour toutes, les partenaires protéiques entravant l'activité de Par-4. Accessoirement, le rôle du TGF- β dans l'expression de XIAP a été bien démontré [191]. En effet, la signalisation autocrine et paracrine du TGF- β permet l'activation de la voie PI3K/Akt en plus de stimuler l'expression de XIAP. Dans ce contexte, il apparaît plausible de croire que l'influence du TGF- β , en plus de stimuler l'expression de Par-4, réduit la stabilité du fragment clivé via l'activité de l'axe PI3K/Akt en plus de réduire l'activité des caspases responsables de l'apparition même du fragment; il semble même possible que XIAP ubiquitine directement Par-4, réduisant les niveaux globaux de la protéine. Dans ce contexte, la population subsistante de Par-4 pleine longueur se verrait hyperphosphorylée et hautement restreinte au niveau cytoplasmique. En accord avec nos résultats, certaines données obtenues par d'autres groupes de chercheurs ont aussi montré que la transcription de Par-4 était stimulée par la voie NF- κ B. De plus, ces mêmes chercheurs ont montré, grâce à plasmide un rapporteur luciférase, que la surexpression de Par-4 stimulait la transcription de cibles de la voie NF- κ B dans l'endomètre [380], en opposition complète avec la dynamique mécanistique classiquement admise. Ce dogme, issu d'observations expérimentales dans un autre contexte tissulaire et dont l'application plus large reste encore à démontrer, reste dominant dans la littérature actuel [372, 422, 423]. Les résultats voulant que l'expression de Par-4 soit contrôlée par p65 sont toutefois cohérents avec ceux que nous avons obtenus; en effet, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre p65 a provoqué une diminution notable des niveaux protéiques de Par-4, illustrant un lien direct entre cette dernière et la voie NF- κ B. Cette boucle de contrôle positif, où p65 contrôle partiellement l'expression de Par-4 et où Par-4 potentialise l'activité de la voie NF- κ B pourrait expliquer le rôle de Par-4 comme promoteur de l'EMT en en addition

avec la place de Par-4 comme modulateur de WT1 et PKC déjà évoquées dans nos écrits publiés. En effet, la voie NF- κ B agit comme régulateur positif de l'EMT, soutenant cette dernière et potentialisant l'action du TGF- β dans l'induction de cette transformation [199, 424, 425]. Au final, un niveau d'incertitude déroutant subsiste quant aux mécanismes expliquant pleinement l'activité de Par-4 dans les modèles utilisés dans notre laboratoire et des informations supplémentaires seront nécessaires afin de faire de la lumière sur cette question épineuse.

6.4 L'utilisation de thérapie combinée comme stratégie thérapeutique

Les résultats obtenus lors de nos expériences ont bien montré l'efficacité augmentée de la combinaison de composés ciblant certaines voies de signalisation avec d'autres molécules au potentiel cytotoxique. Originellement, l'utilisation de la leptomycine B (LMB) en combinaison avec le TRAIL ou le cisplatine avait comme objectif de permettre l'accumulation de Par-4 au niveau nucléaire, permettant et potentialisant ainsi son activité tumoricide attendue. Tel que mentionné précédemment, l'utilisation de la leptomycine B n'a pas permis de sensibiliser les cellules de façon appréciable à l'action cytocide du cisplatine; c'est plutôt le TRAIL qui semblait plus efficace lorsque combiné avec l'inhibiteur de l'exportation nucléaire. Ce résultat semble explicable plausiblement par la nécessité de certains signaux d'échapper au noyau afin d'engager les processus de réponses aux dommages à l'ADN qui sont déployés suivant l'insulte apoptotique faite par l'ADN. En effet, le stress génotoxique provoqué par le cisplatine sera généralement détecté par des kinases nucléaires telles que ATM et ATR; ces dernières phosphoryleront et activeront des cibles telles que Chk2 et p53 qui permettront l'induction du programme de suicide cellulaire à proprement parler [426]. D'une part, p53 en tant que tel présente des activités pro-apoptotiques cytoplasmiques qui pourraient être limitées par la rétention nucléaire provoquée par l'utilisation de la leptomycine B [427]. De plus, la majorité des réponses aux stress génotoxiques tient dans la modulation de l'expression et de la stabilisation de facteurs qui viendront perturber l'équilibre de la multitude de protéines régissant la création d'un pore de perméabilisation mitochondriale. En ce sens, il semble possible que l'inactivation de la navette nucléocytoplasmique CRM1 par la leptomycine

B limite la capacité de certains ARNm à être exprimée adéquatement; en effet, CRM1 joue un rôle important dans la translocalisation des ARNm et son inactivation limite donc implicitement la traduction de plusieurs protéines [426, 428]. Toutefois, considérant que nous observons aussi la modulation de certains gènes dans le contexte de la combinaison de la leptomycine B avec le TRAIL, d'autres mécanismes sont évidemment mis en cause. D'une part, il apparaît plausible que la modulation de certains gènes est plus cruciale dans la sensibilisation des cellules à l'action du TRAIL que du cisplatine. Par exemple, MCL-1 et FLIP ont été identifiés comme des modulateurs centraux de la sensibilité des cellules cancéreuses à l'effet pro-apoptotiques du TRAIL [286]; les niveaux de ces deux protéines sont diminués lors de l'utilisation concomitante de TRAIL et de leptomycine B. L'autre volet de cette question s'intéresse à l'influence de p53, ou l'absence de celle-ci, dans le processus d'induction de l'apoptose provoqué par cette même thérapie combinée. Nos résultats suggèrent que p53 ne semble pas nécessaire à l'induction de la mort cellulaire par cette approche thérapeutique; de surcroît, p53 pourrait même s'opposer partiellement à l'efficacité de cette stratégie. De ce fait, et en considérant que les protéines FOXO sont exportées activement par la machinerie de translocalisation nucléocytoplasmique, soit par leur interaction directe ou par l'interaction avec 14-3-3 suivant leur phosphorylation par Akt, il semble juste de croire que l'interférence avec l'activité de CRM1 soit responsable de favoriser l'enrichissement nucléaire observée de ce facteur de transcription et que ce soit ce dernier qui soit en partie responsable de l'effet observé; il en va vraisemblablement de même dans le cas des thérapies utilisant l'AZD5363. Des expériences mettant en scène des lignées cellulaires transduites avec des vecteurs d'expression de shRNA dirigé contre FOXO1 et FOXO3A, inductibles à la doxycycline, permettraient de répondre à cette question facilement.

En ce qui a trait à la différence observée entre l'efficacité des molécules NVP-BEZ235 et l'AZD5363, l'apparente binarité des résultats mis en lumière est particulièrement intéressante. En effet, l'AZD5363 semblait plus efficace lorsqu'utilisé avec la doxorubicine, un effet distinct de celui du NVP-BEZ235, qui potentialise particulièrement bien le cisplatine. De plus, l'AZD5363 semble largement plus efficace à diminuer la phosphorylation de S6 et de GSK3 β , un effet qui pourrait expliquer sa plus

grande efficacité thérapeutique dans notre contexte cellulaire et sa capacité à induire l'apoptose lorsque combiné à la doxorubicine. Lorsque l'AZD5363 est combiné avec la doxorubicine, une diminution de MCL-1, de BCL-2 et de XIAP est aussi observable. Finalement, de façon similaire aux résultats obtenus dans le contexte de la leptomycine, une localisation nucléaire de FOXO1 et de p53 est retrouvée suivant l'utilisation de l'AZD5363. De façon intéressante, cette localisation apparaît non seulement lorsque les molécules sont combinées, mais aussi lorsque de l'utilisation singulière de l'AZD5363. Ce résultat est en accord avec les résultats démontrant la capacité de cet inhibiteur à moduler plusieurs voies de signalisation sans pour autant arriver à induire une réduction de la viabilité cellulaire ou même l'apoptose. On peut donc penser que l'AZD5363 permet de préparer les cellules à l'action de la doxorubicine grâce à cette modulation de la phosphorylation de plusieurs protéines et la localisation nucléaire de facteurs pro-apoptotiques et que c'est la somme de ces modifications qui potentialise l'activité cytocide de la doxorubicine (Fig. 6.6). De plus, dans ce contexte, il semble juste de croire que l'utilisation singulière d'AZD5363 dans un contexte thérapeutique pourrait mener l'expérimentateur à croire que la molécule n'est pas appropriée pour traiter une tumeur; toutefois, en l'absence de combinaisons avec une molécule cytotoxique, il semble prématuré de tirer des conclusions.

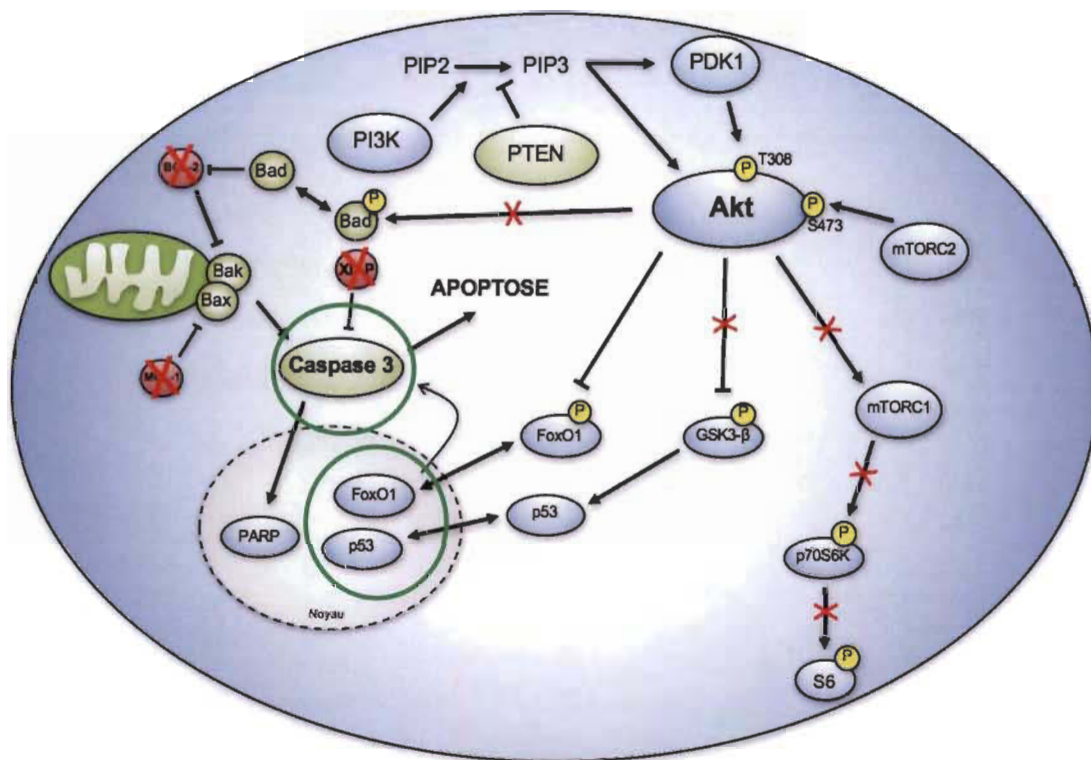


Figure 6.6 Représentation diagrammatique des voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des cellules par la combinaison de la doxorubicine et de l'AZD5363

Tel que démontré dans notre étude, la combinaison thérapeutique utilisée permet l'abrogation de la phosphorylation faite par Akt (p70S6K, S6, GSK3 β , Bad), la localisation nucléaire de facteur de transcription pro-apoptotique (FoxO1 et p53), l'inhibition de protéines anti-apoptotiques (XIAP, BCL-2 et MCL-1), ce qui converge vers l'induction de l'apoptose (caspase-3 clivée et PARP clivé).

Incidentement, il semble important de mentionner les ramifications signalétiques qui unissent la voie PI3K/Akt et la voie MAPK. L'inhibition de la voie PI3K provoque souvent une activation erratique et parallèle de la voie MAPK [252, 429]. On peut penser que le NVP-BEZ235 un inhibiteur en amont de la voie PI3K, provoque une plus grande activation de la voie MAPK, à la différence de l'AZD5363 qui agit comme un inhibiteur plus en aval et agissant directement sur Akt. Nos résultats montrent que l'utilisation combinée de l'AZD5363 et de la doxorubicine provoque la diminution de plusieurs protéines responsables de l'inhibition de l'induction de l'apoptose, la localisation de p53 et de FOXO1 au niveau nucléaire, et la diminution de l'activation de Erk. C'est la sommation de ces conditions qui permet probablement l'effet synergique de cette

combinaison. Toutefois, il reste impossible d'assurer l'efficacité de cette approche dans le contexte complexe d'un microenvironnement tumoral qui pourrait complètement modifier la réponse cellulaire à la thérapie combinée. Les niveaux de toxicité de ces deux composés, lorsqu'utilisés simultanément, pourraient aussi limiter l'utilité réelle de cette approche. Afin de répondre à ces questions, nous procéderons à des expériences *in vivo* faisant usage de souris immunocompromises et auxquelles nous injecterons des cellules de façon sous-cutanée afin de générer des xénogreffes. Pour ce faire, des cellules ECC-1 et A2780CP seront mélangées à du matrigel et injectées sur les flancs des souris. Leur système immunitaire étant largement inefficace, les cellules ainsi implantées pourront proliférer; la taille tumorale sera mesurée avec un pied à coulisse pour évaluer l'effet des divers régimes thérapeutiques testés. En phase avec les essais cliniques les plus récents et des expérimentations animales, des doses de 100mg/kg seront octroyées deux fois par jour par gavage orale [336, 340, 430]. La doxorubicine liposomale nous apparaît particulièrement intéressante étant donné ses caractéristiques pharmacodynamiques avantageuses et son utilisation dans les cas de cancers ovariens résistants aux platines et de cancers endométriaux récurrents [429-434]. Nous combinerons donc les traitements d'AZD5363 avec la doxorubicine liposomale à raison de 5mg/kg de façon intrapéritonéale; ce traitement sera fait seulement lors du premier jour du cycle de traitement afin de mimer les régimes de chimiothérapie octroyés aux femmes en cliniques [435-437] (Fig. 6.7).

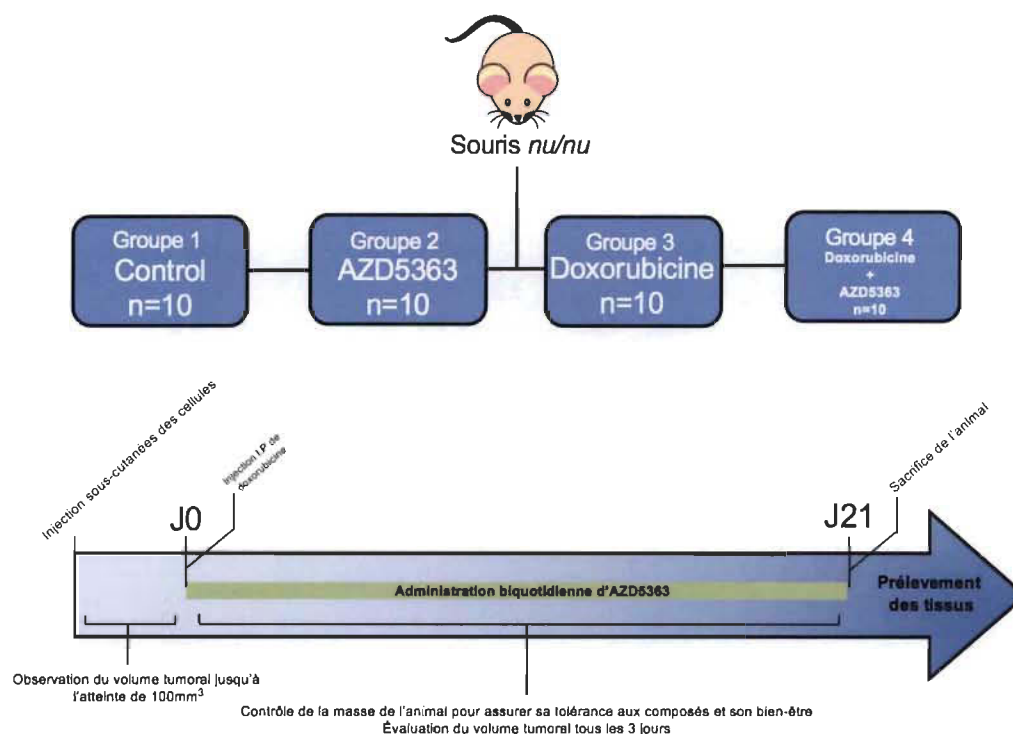


Figure 6.7 Représentation diagrammatique de l'expérimentation pré-clinique de la thérapie combinée AZD5363 et doxorubicine

Suivant le suivi de la croissance tumorale, des analyses biochimiques par Western blot et immunohistochimie pourront confirmer les résultats précédemment obtenus dans les lignées cellulaires étudiées. Tout d'abord, le Western blot servira principalement à mesurer les niveaux de phospho-Bad afin d'établir si la régulation drastique de cette voie de signalisation semble aussi cruciale que les résultats préliminaires l'ont suggéré; accessoirement, les niveaux de XIAP, BCL-2 et MCL-1 pourront être mesurés pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Ensuite, grâce à l'immunohistochimie, la localisation nucléaire de FoxO1 et de p53 sera évaluée, de pair avec le clivage de la caspase-3. Ces expériences permettront aussi de mesurer la toxicité et la tolérabilité de la combinaison des molécules dans le vivant. Finalement, bien évidemment, le suivi serré de la croissance tumorale permettra d'évaluer l'efficacité réelle de notre thérapie et de valider la pertinence de cette dernière.

6.5 Conclusion

La somme de nos travaux met en évidence la complexité de l'axe de régulation PI3K/Akt et sa possible interaction avec un suppresseur de tumeur putatif, Par-4. Plusieurs étapes expérimentales successives auront été nécessaires afin de débiter le défrichement de cette labyrinthique relation et nous émergeons avec plus de questions que de réponse. La somme des observations permet de faire émerger certains constats qui suscitent à la fois un intérêt, mais aussi un cynisme et une certaine consternation. Tout d'abord, la protéine Par-4 me semble une actrice de plusieurs voies de signalisation cellulaire dont le rôle réel a été obstrué par l'adhésion de certains auteurs à un dogme qu'ils ont eux-mêmes élaboré. Le manque exceptionnel de consensus et la non-reproductibilité de certains de leurs résultats, en plus de la proximité académique de plusieurs de ces auteurs, me poussent à croire que certaines conclusions tirées jusqu'à maintenant font fit de certaines observations écartés de par leur non-compliance avec l'hypothèse soutenue. C'est là, à mon sens, l'une des grandes tares de la notre système publicationnel, qui a indûment court-circuité la méthode scientifique au profit de la publication entièrement sous-tendue par la poursuite et la confirmation d'hypothèses positives. Une certaine gymnastique intellectuelle semble être nécessaire pour pallier les résultats montrant la nécessité d'un domaine SAC, dont la fonction inconnue et sans homologie fonctionnelle démontrable, et son entrée au noyau, le tout en absence d'un leucine zipper. La localisation principalement cytoplasmique de Par-4 dans plusieurs modèles a aussi été expliquée par un processus silyllin, maintenant considéré comme canonique, où GRP78, une chaperone servant au repliement protéique et agissant comme senseur intrinsèque du stress traductionnel et conformationnel des protéines nascentes aurait la fonction de lier Par-4 au niveau du ER, le faire transiter par vésiculation au niveau de la membrane plasmique et que ce même Par-4 serait recapturé par GRP78 afin d'induire des voies apoptotiques extrinsèques [438]. Ce même article présente une section méthodologique anémique et caractérisée par une déplorable absence d'explications, ce qui rend très difficile la reproductibilité des expériences. La voie de signalisation ainsi décrite, qui plus est à l'aide d'une seule lignée cellulaire, fait office de base théorique pour le déploiement d'une multitude d'autres démonstrations, toutes publiées dans d'excellents journaux. Il semble, à mon sens,

implausible que la cellule use de mécanismes aussi complexes et énergétiquement défavorables; je crois la biologie une implicite disciple, ou maîtresse, du rasoir d'Occam et des démonstrations éminemment plus rigoureuses sont selon moi nécessaires pour étayer le modèle actuellement accepté, et préconisé par un groupe d'auteurs établissant le courant dominant de pensée, des mécanismes moléculaires entourant l'activité de Par-4. Encore une fois, le besoin inéluctable de publications limite la capacité de la communauté scientifique à tenter de reproduire des expériences, un exercice de validation absolument fondamental à la construction sociale qu'est la science; il est encore plus impopulaire, pour des questions politiques, de remettre en question les écrits dominants. Il m'apparaît d'une importance souveraine de revoir et d'abattre ces entraves à notre capacité d'atteindre la vérité objective.

Un certain questionnement m'habite aussi concernant la théorie dominante permettant l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes. Alors que pendant des années l'approche par tâtonnement était l'une des seules stratégies valables, l'avènement du séquençage génomique, d'abord standard et éventuellement à haut débit, a permis l'émergence d'un paradigme de base fort attrayant : l'identification de mutations activatrices de protéines proto-oncogènes sont à la base du processus de tumorigénèse et du maintien de cette même tumeur. Les attaquer pharmacologiquement revêt donc le plus grand potentiel thérapeutique et c'est dans le développement de molécules frappant ces mutations que tient notre salut face à ces affections terribles. Or, depuis plusieurs années, de plus en plus de données émergent et nous permettent d'affirmer, avec une quasi-certitude, que les tumeurs ne dépendent pas seulement d'une mutation directrice unique leur octroyant un potentiel reproductif superlatif [439]; cette information est évidemment bien comprise, et a forcé l'émergence de thérapies combinées frappant ces tumeurs de plusieurs assauts simultanés, provoquant la mort cellulaire par le bris de plusieurs fondations moléculaires soutenant l'édifice biologique qu'est le cancer. Ce type de stratégie ne date pas d'hier, les premières thérapies combinées étant apparues en 1965, alors que James Holland et Emil Freireich énonçaient l'hypothèse que les molécules chimiothérapeutiques pourraient être combinées de la même façon que les thérapies polyanthibiotiques permettant le traitement efficace de la tuberculose [440, 441]. Toutefois,

déterminer de façon objective et rationnelle les cibles prospectives les plus efficaces pour les molécules constituant ces thérapies reste encore l'un des défis les plus prenants et les plus activement examinés du domaine de l'oncologie. Alors qu'on croyait autrefois que les cellules cancéreuses étaient suffisamment distinctes de leurs comparses normales pour permettre la simple utilisation de composés cytotoxiques, ciblant les cellules en réplication rapide de façon préférentielle, l'histoire aura bien montré que cette stratégie présentait une multitude de limites cliniques, de la toxicité à l'émergence de résistance au sein de la tumeur.

Afin de contrer ces problématiques, d'améliorer l'efficacité des thérapies, de contrer la chimiorésistance et de limiter les effets secondaires, la thérapie à cible moléculaire spécifique a fait son entrée dans l'armementarium moderne. Le paradigme le plus ancien de thérapie ciblée, et qui aura dirigé des décennies de développement pharmacologique, veut que de toucher une mutation particulièrement représentée dans une tumeur permettra d'endiguer l'avantage prolifératif de cette tumeur. Notre arme principale dans cette quête aura été le séquençage de l'ADN, technique autrefois nouvelle qui permettait de cerner les modifications délétères habitant le génome. Cette méthode permettait aux scientifiques de déterminer les véritables causes de la transformation oncogénique en étudiant directement la source du dérèglement. Toutefois, cette technique ne permettait malheureusement pas, avant l'avènement de l'invention du RNAseq à haut débit et des outils de modification génétique de haute efficacité, de mesurer de façon causative le rôle des mutations de façon large, adoptant plutôt un design facilitant l'émergence de conclusions corrélatives. Les travaux exceptionnels du docteur William C. Hahn du Dana Farber Institute [442] ont confirmés une conclusion qui depuis longtemps s'annonçait comme fracassante pour l'intégrité de la démarche classique. En effet, leur expérimentation, mettant en scène plus de 500 lignées cellulaires provenant de tous les organes soumis à l'effet de 100 000 shRNA touchant plus de 17 000 gènes répertoriés, avait comme objectif de déterminer de façon causative et objective les gènes dont les cellules cancéreuses dépendent le plus. Or, leurs résultats soulignent deux conclusions qui m'apparaissent mériter une certaine contemplation. D'abord, le gène dont les cellules ciblées semblent dépendre de façon la plus écrasante est PIK3CA, gène codant pour la

protéine PI3K, avec une co-dépendance pour Akt1 et mTOR; ce résultat souligne la place absolument cruciale de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans la tumorigénèse et l'état généralisé de dérouté signalétique qui caractérise la néoplasie. Ensuite, l'étude met en évidence que, dans 82% des cas, le prédicteur le plus puissant de la sensibilité d'une cellule tumorale à un gène spécifique ne tient pas dans les mutations de sa séquence codante mais bien dans les niveaux de son expression d'ARNm. Alors que le standard clinique s'engage de plus en plus vers un modèle de traitement préconisant le séquençage personnalisé afin de caractériser les mutations retrouvées dans le génome du patient, il est possible de croire que cette stratégie d'identification de cibles moléculaires soit déjà désuète. En évoquant la place centrale de l'expression génique dans la prédiction de l'importance globale d'un gène spécifique dans la tumeur, on souligne la pertinence d'utiliser une mesure qui intègre une multitude de variables, comme la méthylation, la présence de microARN ou l'interférence complexe des lncRNA, ces transcrits d'ARN de plus de 200 nucléotides mais ne codant pour aucune protéines [443]. Ce type de méthodologies devraient donc, à terme, être à la base de nos efforts de découverte pharmacologique ainsi que mécanistique; ces résultats pourront efficacement diriger l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer le traitement octroyé aux patients et, un jour, se départir du fardeau millénaire que représente le cancer, cet empereur des maladies.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Standring, S., *Gray's Anatomy International Edition: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 2015: Elsevier Health Sciences.
2. Jones, R.E. and K.H. Lopez, *Human reproductive biology*. 2013: Academic Press.
3. Eroschenko, V.P. and M.S. Di Fiore, *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. 2013: Lippincott Williams & Wilkins.
4. Jiménez-Ayala, M. and B.J.-A. Portillo, *Endometrial adenocarcinoma: prevention and early diagnosis*. 2008: Karger Medical and Scientific Publishers.
5. Gellersen, B. and J.J. Brosens, *Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure*. *Endocr Rev*, 2014. **35**(6): p. 851-905.
6. Marieb, E.N. and K. Hoehn, *Human anatomy & physiology*. 2007: Pearson Education.
7. Reed, B.G. and B.R. Carr, *The normal menstrual cycle and the control of ovulation*, in *Endotext [Internet]*. 2015, MDText. com, Inc.
8. Parakh, T.N., et al., *Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(33): p. 12435-40.
9. Barbieri, R.L., *The endocrinology of the menstrual cycle*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1154**: p. 145-69.
10. Tuckey, R.C., *Progesterone synthesis by the human placenta*. *Placenta*, 2005. **26**(4): p. 273-81.
11. Leung, P.C., A.J. Hsueh, and H.G. Friesen, *Molecular basis of reproductive endocrinology*. 2012: Springer Science & Business Media.
12. Skinner, D.C., et al., *The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10978-83.
13. Herbison, A.E. and J.R. Pape, *New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons*. *Front Neuroendocrinol*, 2001. **22**(4): p. 292-308.
14. Williams, W.P., 3rd, et al., *Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge*. *Endocrinology*, 2011. **152**(2): p. 595-606.

15. Smith, J.T., et al., *Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence*. Endocrinology, 2011. **152**(3): p. 1001-12.
16. Tng, E.L., *Kisspeptin signalling and its roles in humans*. Singapore Med J, 2015. **56**(12): p. 649-56.
17. Dubois, S.L., et al., *Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor alpha in kisspeptin neurons*. Endocrinology, 2015. **156**(3): p. 1111-20.
18. Roa, J., et al., *Opposite roles of estrogen receptor (ER)-alpha and ERbeta in the modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat: implications for the generation of the preovulatory surge*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1627-37.
19. Chada, M., et al., *Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol and their relationship to the regulation of follicle development in girls during childhood and puberty*. Physiol Res, 2003. **52**(3): p. 341-6.
20. Messinis, I.E., *Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(5): p. 557-71.
21. Young, J.R. and R.B. Jaffe, *Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol*. J Clin Endocrinol Metab, 1976. **42**(3): p. 432-42.
22. Curry, T.E., Jr. and M.F. Smith, *Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition*. Semin Reprod Med, 2006. **24**(4): p. 228-41.
23. Reich, R., et al., *Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids*. Endocrinology, 1991. **129**(4): p. 1869-75.
24. Mesen, T.B. and S.L. Young, *Progesterone and the luteal phase: a requisite to reproduction*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015. **42**(1): p. 135-51.
25. Cole, L.A., *Biological functions of hCG and hCG-related molecules*. Reprod Biol Endocrinol, 2010. **8**: p. 102.
26. Tan, J., et al., *Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse*. Endocrinology, 1999. **140**(11): p. 5310-21.
27. Melmed, S., *Williams textbook of endocrinology*. 2016: Elsevier Health Sciences.

28. Denker, H.W., *Implantation: a cell biological paradox*. J Exp Zool, 1993. **266**(6): p. 541-58.
29. Johnson, G.A., et al., *Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 1951-8.
30. Bischof, P. and A. Campana, *A model for implantation of the human blastocyst and early placentation*. Hum Reprod Update, 1996. **2**(3): p. 262-70.
31. Emera, D., R. Romero, and G. Wagner, *The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness*. Bioessays, 2012. **34**(1): p. 26-35.
32. Yu, J., et al., *Endometrial Stromal Decidualization Responds Reversibly to Hormone Stimulation and Withdrawal*. Endocrinology, 2016. **157**(6): p. 2432-46.
33. Zhang, X.H., et al., *The mesenchymal-epithelial transition during in vitro decidualization*. Reprod Sci, 2013. **20**(4): p. 354-60.
34. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
35. Schatz, F., et al., *The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding*. Hum Reprod Update, 2016. **22**(4): p. 497-515.
36. Fabi, F. and E. Asselin, *Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus*. Reproduction, 2014. **148**(5): p. R85-95.
37. Fabi, F., et al., *Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177387.
38. Sharma, A. and P. Kumar, *Understanding implantation window, a crucial phenomenon*. J Hum Reprod Sci, 2012. **5**(1): p. 2-6.
39. Keith Ho, H.C., et al., *Serglycin proteoglycan synthesis in the murine uterine decidua and early embryo*. Biol Reprod, 2001. **64**(6): p. 1667-76.
40. Arceci, R.J., et al., *Temporal expression and location of colony-stimulating factor I (CSF-1) and its receptor in the female reproductive tract are consistent with CSF-1-regulated placental development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8818-22.
41. Pollard, J.W., et al., *A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility*. Dev Biol, 1991. **148**(1): p. 273-83.

42. Kim, M., et al., *VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(9): p. 1415-30.
43. Hyder, S.M. and G.M. Stancel, *Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(6): p. 806-11.
44. Shaw, J.L., et al., *Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy*. Fertil Steril, 2010. **94**(5): p. 1601-8 e1.
45. LeCouter, J., et al., *Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium*. Nature, 2001. **412**(6850): p. 877-84.
46. Macdonald, L.J., et al., *Prokineticin 1 induces Dickkopf1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium*. Mol Hum Reprod, 2011. **17**(10): p. 626-36.
47. Evans, J., et al., *Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy*. Endocrinology, 2008. **149**(6): p. 2877-87.
48. Kennedy, T.G., C. Gillio-Meina, and S.H. Phang, *Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization*. Reproduction, 2007. **134**(5): p. 635-643.
49. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
50. Evans, J., et al., *Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor*. FASEB J, 2009. **23**(7): p. 2165-75.
51. Suman, P., N. Shembekar, and S.K. Gupta, *Leukemia inhibitory factor increases the invasiveness of trophoblastic cells through integrated increase in the expression of adhesion molecules and pappalysin 1 with a concomitant decrease in the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*. Fertil Steril, 2013. **99**(2): p. 533-42.
52. Menkhorst, E., et al., *Vaginally administered PEGylated LIF antagonist blocked embryo implantation and eliminated non-target effects on bone in mice*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19665.
53. Robb, L., et al., *Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 303-8.
54. Mueller, M.D., et al., *Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells*. Fertil Steril, 2003. **79**(2): p. 386-92.

55. Battersby, S., et al., *Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2463-9.
56. Vinketova, K., M. Mourdjeva, and T. Oreshkova, *Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity*. J Pregnancy, 2016. **2016**: p. 8689436.
57. Garrido-Gomez, T., et al., *Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(40): p. E8468-E8477.
58. Kusama, K., et al., *Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac)*. Placenta, 2013. **34**(3): p. 212-21.
59. Telgmann, R. and B. Gellersen, *Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene*. Human Reproduction Update, 1998. **4**(5): p. 472-479.
60. Aghajanova, L., et al., *Unique transcriptome, pathways, and networks in the human endometrial fibroblast response to progesterone in endometriosis*. Biol Reprod, 2011. **84**(4): p. 801-15.
61. Frank, G.R., et al., *Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 258-63.
62. Tang, B. and E. Gurpide, *Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **47**(1-6): p. 115-21.
63. Brar, A.K., et al., *Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP*. Endocrine, 1997. **6**(3): p. 301-7.
64. Matsuoka, A., et al., *Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. E291-9.
65. Gellersen, B. and J. Brosens, *Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair*. J Endocrinol, 2003. **178**(3): p. 357-72.
66. Christian, M., et al., *Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms: promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 141-54.

67. Al-Sabbagh, M., et al., *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediate decidualization of human endometrial stromal cells in response to cyclic AMP signaling*. Endocrinology, 2011. **152**(2): p. 730-40.
68. Kajihara, T., J.J. Brosens, and O. Ishihara, *The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy*. Med Mol Morphol, 2013. **46**(2): p. 61-8.
69. Tamura, I., et al., *The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization*. J Biol Chem, 2018. **293**(14): p. 5270-5280.
70. Vasquez, Y.M., et al., *FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(3): p. 421-33.
71. Lalmansingh, A.S., et al., *Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1819**(7): p. 707-15.
72. van der Heide, L.P. and M.P. Smidt, *Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(2): p. 81-6.
73. Daitoku, H., et al., *Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10042-7.
74. Labied, S., et al., *Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(1): p. 35-44.
75. Christian, M., et al., *Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20825-32.
76. Takano, M., et al., *Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(10): p. 2334-49.
77. Schroeder, J.K., C.A. Kessler, and S. Handwerger, *Critical role for TWIST1 in the induction of human uterine decidualization*. Endocrinology, 2011. **152**(11): p. 4368-76.
78. Kajihara, T., et al., *Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(10): p. 2444-55.

79. Kyo, S., et al., *Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(3): p. 525-37.
80. Brosens, J.J. and B. Gellersen, *Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma*. J Mol Endocrinol, 2006. **36**(3): p. 389-98.
81. Sugimoto, Y., et al., *Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(7): p. 2117-21.
82. Auger, K.R., et al., *PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells*. Cell, 1989. **57**(1): p. 167-75.
83. Whitman, M., et al., *Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation*. Nature, 1985. **315**(6016): p. 239-42.
84. Jean, S. and A.A. Kiger, *Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 5): p. 923-8.
85. Salvesen, H.B., H.M. Werner, and C. Krakstad, *PI3K pathway in gynecologic malignancies*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2013.
86. Furth, J., *The creation of the AKR strain, whose DNA contains the genome of a leukemia virus*. Cancer Research Institute, NIAID: Academic Press, 1978.
87. Staal, S.P., J.W. Hartley, and W.P. Rowe, *Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(7): p. 3065-3067.
88. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(14): p. 5034-5037.
89. Bellacosa, A., S. Staal, and P. Tsichlis, *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region*. Science, 1991. **254**(5029): p. 274-277.
90. Brodbeck, D., P. Cron, and B.A. Hemmings, *A human protein kinase Bγ with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(14): p. 9133-9136.

91. COFFER, P.J. and J.R. WOODGETT, *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*. European Journal of Biochemistry, 1991. **201**(2): p. 475-481.
92. Liao, Y. and M.C. Hung, *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res, 2010. **2**(1): p. 19-42.
93. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
94. Hennessy, B.T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(12): p. 988-1004.
95. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
96. Bayascas, J.R., et al., *Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3258-72.
97. Vainshtein, I., K.S. Kovacina, and R.A. Roth, *The insulin receptor substrate (IRS)-1 pleckstrin homology domain functions in downstream signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8073-8.
98. Franke, T.F., et al., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*. Science, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
99. Thomas, C.C., et al., *High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*. Curr Biol, 2002. **12**(14): p. 1256-62.
100. Kamimura, Y. and P.N. Devreotes, *Phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK) activity regulates phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent and -independent protein kinase B activation and chemotaxis*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 7938-46.
101. Denley, A., et al., *Requirement of phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate in phosphatidylinositol 3-kinase-induced oncogenic transformation*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(7): p. 1132-8.
102. Frech, M., et al., *High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8474-81.
103. Raimondi, C. and M. Falasca, *Targeting PDK1 in cancer*. Curr Med Chem, 2011. **18**(18): p. 2763-9.

104. Mora, A., et al., *PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(2): p. 161-70.
105. Yang, J., et al., *Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(12): p. 940-4.
106. Kunkel, M.T., et al., *Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5581-7.
107. Ebner, M., et al., *PI(3,4,5)P3 Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes*. Mol Cell, 2017. **65**(3): p. 416-431 e6.
108. Jethwa, N., et al., *Endomembrane PtdIns(3,4,5)P3 activates the PI3K-Akt pathway*. J Cell Sci, 2015. **128**(18): p. 3456-65.
109. Tzivion, G., M. Dobson, and G. Ramakrishnan, *FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1938-45.
110. Schachter, T.N., et al., *Kinetics of nuclear-cytoplasmic translocation of Foxo1 and Foxo3A in adult skeletal muscle fibers*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(9): p. C977-90.
111. van der Vos, K.E. and P.J. Coffey, *The extending network of FOXO transcriptional target genes*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(4): p. 579-92.
112. Kaidanovich-Beilin, O. and J.R. Woodgett, *GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 40.
113. Thomas, G.M., et al., *A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin*. FEBS Lett, 1999. **458**(2): p. 247-51.
114. Maurer, U., et al., *GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 7): p. 1369-78.
115. McManus, E.J., et al., *Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis*. EMBO J, 2005. **24**(8): p. 1571-83.
116. Koo, J., et al., *mTOR Complex 2 Stabilizes Mcl-1 Protein by Suppressing Its Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent and SCF-FBXW7-Mediated Degradation*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(13): p. 2344-55.
117. Koo, J., et al., *Rictor Undergoes Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)-dependent, FBXW7-mediated Ubiquitination and Proteasomal Degradation*. J Biol Chem, 2015. **290**(22): p. 14120-9.

118. Yang, H., et al., *Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40*. Nature, 2017. **552**(7685): p. 368-373.
119. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
120. Showkat, M., M.A. Beigh, and K.I. Andrabi, *mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions*. Mol Biol Int, 2014. **2014**: p. 686984.
121. Gan, X., et al., *Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 10998-1002.
122. Liu, P., et al., *PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex*. Cancer Discov, 2015. **5**(11): p. 1194-209.
123. Bushnik, T., et al., *Estimating the prevalence of infertility in Canada*. Human reproduction, 2012. **27**(3): p. 738-746.
124. Forti, G. and C. Krausz, *Evaluation and treatment of the infertile couple*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. **83**(12): p. 4177-4188.
125. Bhattacharya, S., et al., *Female infertility*. BMJ Clin Evid, 2010. **2010**.
126. Macer, M.L. and H.S. Taylor, *Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2012. **39**(4): p. 535-49.
127. Ramathal, C.Y., et al., *Endometrial decidualization: of mice and men*. Semin Reprod Med, 2010. **28**(1): p. 17-26.
128. Katzorke, N., et al., *Diagnosis of Endometrial-Factor Infertility: Current Approaches and New Avenues for Research*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2016. **76**(6): p. 699-703.
129. Woods, L., et al., *Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 352.
130. Makker, A., M.M. Goel, and A.A. Mahdi, *PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update*. J Mol Endocrinol, 2014. **53**(3): p. R103-18.
131. Auersperg, N., et al., *Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes*. Lab Invest, 1994. **71**(4): p. 510-8.

132. Evans, M.B. and A.H. Decherney, *Fertility and Endometriosis*. Clin Obstet Gynecol, 2017. **60**(3): p. 497-502.
133. Ozkan, S., W. Murk, and A. Arici, *Endometriosis and infertility*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1127**(1): p. 92-100.
134. Rodgers, A.K. and T. Falcone, *Treatment strategies for endometriosis*. Expert Opin Pharmacother, 2008. **9**(2): p. 243-55.
135. Tosti, C., et al., *Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis*. Reproductive Sciences, 2015. **22**(9): p. 1053-1059.
136. Santamaria, X., E.E. Massasa, and H.S. Taylor, *Migration of cells from experimental endometriosis to the uterine endometrium*. Endocrinology, 2012. **153**(11): p. 5566-74.
137. Agarwal, A., S. Gupta, and S. Sikka, *The role of free radicals and antioxidants in reproduction*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. **18**(3): p. 325-32.
138. Burney, R.O. and L.C. Giudice, *Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis*. Fertility and sterility, 2012. **98**(3): p. 511-519.
139. Wu, M.-H., et al., *Prostaglandin E2: the master of endometriosis?* Experimental biology and medicine, 2010. **235**(6): p. 668-677.
140. Wu, T., et al., *The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(3): p. 299-307.
141. Glynn, S.A., et al., *COX-2 activation is associated with Akt phosphorylation and poor survival in ER-negative, HER2-positive breast cancer*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 626.
142. Sales, K.J., et al., *Prostaglandin E2 mediates phosphorylation and down-regulation of the tuberous sclerosis-2 tumor suppressor (tuberin) in human endometrial adenocarcinoma cells via the Akt signaling pathway*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(12): p. 6112-8.
143. St-Germain, M.-E., et al., *Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells*. International journal of oncology, 2004. **24**(5): p. 1311-1324.
144. Meng, Z., et al., *Prostaglandin E2 regulates Foxo activity via the Akt pathway: implications for pancreatic islet beta cell dysfunction*. Diabetologia, 2006. **49**(12): p. 2959-2968.

145. George, R.J., et al., *EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **83**(1-2): p. 112-20.
146. Yin, X., et al., *Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(1): p. E35-43.
147. cancer, C.c.d.s.c.s.l., *Statistiques canadiennes sur le cancer 2018*. Société Canadienne du Cancer, 2018.
148. Smythies, J., *Intercellular Signaling in Cancer-the SMT and TOFT Hypotheses, Exosomes, Telocytes and Metastases: Is the Messenger in the Message?* J Cancer, 2015. **6**(7): p. 604-9.
149. Bedessem, B. and S. Ruphy, *SMT or TOFT? How the two main theories of carcinogenesis are made (artificially) incompatible*. Acta Biotheor, 2015. **63**(3): p. 257-67.
150. Sigston, E.A.W. and B.R.G. Williams, *An Emergence Framework of Carcinogenesis*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 198.
151. Soto, A.M. and C. Sonnenschein, *The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory*. Bioessays, 2011. **33**(5): p. 332-40.
152. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
153. Gomez, K., et al., *Somatic evolutionary timings of driver mutations*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 85.
154. Hall, A., *Oncogenes--implications for human cancer: a review*. J R Soc Med, 1984. **77**(5): p. 410-6.
155. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
156. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA: a cancer journal for clinicians, 2016. **66**(1): p. 7-30.
157. Martini, M., et al., *PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review*. Annals of medicine, 2014. **46**(6): p. 372-383.
158. Schneikert, J. and J. Behrens, *The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development*. Gut, 2007. **56**(3): p. 417-25.

159. Hamilton, S.R., *The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variations on a theme*. J Cell Biochem Suppl, 1992. **16G**: p. 41-6.
160. Brody, L.C. and B.B. Biesecker, *Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2*. Medicine (Baltimore), 1998. **77**(3): p. 208-26.
161. Piek, J.M., et al., *BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis*. Gynecol Oncol, 2003. **90**(2): p. 491.
162. Narod, S.A. and L. Salmena, *BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer*. Discov Med, 2011. **12**(66): p. 445-53.
163. Bailey, M.H., et al., *Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations*. Cell, 2018. **173**(2): p. 371-385 e18.
164. Zhang, J. and S. Zhang, *Discovery of cancer common and specific driver gene sets*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(10): p. e86.
165. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
166. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
167. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(25): p. 2449-60.
168. Armaghany, T., et al., *Genetic alterations in colorectal cancer*. Gastrointest Cancer Res, 2012. **5**(1): p. 19-27.
169. Chin, Y.R., et al., *PTEN-deficient tumors depend on AKT2 for maintenance and survival*. Cancer Discov, 2014. **4**(8): p. 942-55.
170. Suman, S., et al., *Activation of AKT signaling promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in colorectal cancer cells*. Mol Carcinog, 2014. **53** **Suppl 1**: p. E151-60.
171. Li, X.L., et al., *P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(1): p. 84-93.
172. Dagogo-Jack, I. and A.T. Shaw, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(2): p. 81-94.
173. Nakaya, Y. and G. Sheng, *EMT in developmental morphogenesis*. Cancer Lett, 2013. **341**(1): p. 9-15.
174. Tanaka, Y., et al., *Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer*. Cancer Biol Ther, 2013. **14**(1): p. 13-9.

175. Takai, M., et al., *The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer*. J Ovarian Res, 2014. **7**: p. 76.
176. George, S.H., R. Garcia, and B.M. Slomovitz, *Ovarian Cancer: The Fallopian Tube as the Site of Origin and Opportunities for Prevention*. Front Oncol, 2016. **6**: p. 108.
177. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
178. Zavadil, J., et al., *Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(12): p. 6686-91.
179. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
180. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
181. Lamouille, S. and R. Derynck, *Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway*. J Cell Biol, 2007. **178**(3): p. 437-51.
182. Goc, A., et al., *TGFbeta- and bleomycin-induced extracellular matrix synthesis is mediated through Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR)*. J Cell Physiol, 2011. **226**(11): p. 3004-13.
183. Kumawat, K., et al., *Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF-beta-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells*. FASEB J, 2013. **27**(4): p. 1631-43.
184. Roberts, A.B., B.K. McCune, and M.B. Sporn, *TGF-beta: regulation of extracellular matrix*. Kidney Int, 1992. **41**(3): p. 557-9.
185. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain, *TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 117-29.
186. Tang, B., et al., *TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1116-24.
187. Siegel, P.M. and J. Massague, *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 807-21.
188. Brabletz, T., et al., *EMT in cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(2): p. 128-134.

189. Kang, Y. and J. Massague, *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, 2004. **118**(3): p. 277-9.
190. Martin, T.A. and W.G. Jiang, *Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 872-91.
191. Van Themsche, C., et al., *XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 216.
192. Haynes, J., et al., *Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(24): p. 4750-64.
193. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 156-72.
194. Wang, Y. and W.Y. Lui, *Transforming growth factor-beta1 attenuates junctional adhesion molecule-A and contributes to breast cancer cell invasion*. Eur J Cancer, 2012. **48**(18): p. 3475-87.
195. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
196. Heldin, C.H., M. Vanlandewijck, and A. Moustakas, *Regulation of EMT by TGFbeta in cancer*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1959-70.
197. Vichalkovski, A., et al., *PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage*. Oncogene, 2010. **29**(24): p. 3554-65.
198. Julien, S., et al., *Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition*. Oncogene, 2007. **26**(53): p. 7445-56.
199. Huber, M.A., et al., *NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 569-81.
200. Xu, W., Z. Yang, and N. Lu, *A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition*. Cell Adh Migr, 2015. **9**(4): p. 317-24.
201. Bakin, A.V., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36803-10.
202. Cress, R.D., et al., *Characteristics of Long-Term Survivors of Epithelial Ovarian Cancer*. Obstet Gynecol, 2015. **126**(3): p. 491-7.

203. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(3): p. 433-43.
204. Bowtell, D.D., et al., *Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(11): p. 668-79.
205. Labidi-Galy, S.I., et al., *High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1093.
206. Weinberger, V., et al., *Serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) - clinical impact and management*. Expert Rev Anticancer Ther, 2016. **16**(12): p. 1311-1321.
207. Terada, K.Y., H.J. Ahn, and B. Kessel, *Differences in risk for type 1 and type 2 ovarian cancer in a large cancer screening trial*. J Gynecol Oncol, 2016. **27**(3): p. e25.
208. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. **42**(7): p. 918-31.
209. Cho, K.R. and I.-M. Shih, *Ovarian cancer*. Annual Review of Pathological Mechanical Disease, 2009. **4**: p. 287-313.
210. Santin, A.D., et al., *Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy*. Int J Cancer, 2004. **112**(1): p. 14-25.
211. Colombo, P.E., et al., *Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2014. **89**(2): p. 207-16.
212. Cornelison, R., D.C. Llaneza, and C.N. Landen, *Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
213. Schuijjer, M. and E.M. Berns, *TP53 and ovarian cancer*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 285-91.
214. Sallum, L.F., et al., *WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis*. Oncotarget, 2018. **9**(22): p. 15818-15827.
215. Mayr, D., et al., *Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays*. Am J Clin Pathol, 2006. **126**(1): p. 101-9.

216. Albertson, D.G., *Gene amplification in cancer*. Trends Genet, 2006. **22**(8): p. 447-55.
217. Howlader N, N.A., Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds), *SEER Cancer Statistics Review*. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, 2014. **National Cancer Institute**.
218. Arora, V. and M.A. Quinn, *Endometrial cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012. **26**(3): p. 311-24.
219. Muss, H.B., *Chemotherapy of metastatic endometrial cancer*. Semin Oncol, 1994. **21**(1): p. 107-13.
220. Humber, C.E., et al., *Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 409-20.
221. Tejerizo-Garcia, A., et al., *Overall survival and disease-free survival in endometrial cancer: prognostic factors in 276 patients*. Onco Targets Ther, 2013. **9**: p. 1305-13.
222. Plataniotis, G., M. Castiglione, and E.G.W. Group, *Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 2010. **21**(suppl_5): p. v41-v45.
223. Robbins, J.R., et al., *Is time to recurrence after hysterectomy predictive of survival in patients with early stage endometrial carcinoma?* Gynecol Oncol, 2012. **127**(1): p. 38-42.
224. Odagiri, T., et al., *Multivariate survival analysis of the patients with recurrent endometrial cancer*. J Gynecol Oncol, 2011. **22**(1): p. 3-8.
225. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. **15**(1): p. 10-7.
226. Ko, E.M., et al., *The complex triad of obesity, diabetes and race in Type I and II endometrial cancers: prevalence and prognostic significance*. Gynecol Oncol, 2014. **133**(1): p. 28-32.
227. Setiawan, V.W., et al., *Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors?* J Clin Oncol, 2013. **31**(20): p. 2607-18.
228. Bansal, N., V. Yendluri, and R.M. Wenham, *The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies*. Cancer Control, 2009. **16**(1): p. 8-13.

229. Wild, P.J., et al., *p53 suppresses type II endometrial carcinomas in mice and governs endometrial tumour aggressiveness in humans*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(8): p. 808-24.
230. Salvesen, H.B., et al., *Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4834-9.
231. Taddei, M.L., et al., *Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 380-93.
232. Galluzzi, L., et al., *Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease*. Annu Rev Pathol, 2017. **12**: p. 103-130.
233. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
234. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
235. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4798-811.
236. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
237. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8628-33.
238. Amaral, J.D., et al., *The role of p53 in apoptosis*. Discov Med, 2010. **9**(45): p. 145-52.
239. Ozaki, T. and A. Nakagawara, *Role of p53 in Cell Death and Human Cancers*. Cancers (Basel), 2011. **3**(1): p. 994-1013.
240. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
241. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a001008.
242. Janicke, R.U., D. Sohn, and K. Schulze-Osthoff, *The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53*. Cell Death Differ, 2008. **15**(6): p. 959-76.
243. Shi, D. and W. Gu, *Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity*. Genes Cancer, 2012. **3**(3-4): p. 240-8.

244. Shangary, S. and S. Wang, *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5318-24.
245. Hoffman, W.H., et al., *Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3247-57.
246. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
247. Johnstone, R.W., A.J. Frew, and M.J. Smyth, *The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(10): p. 782-98.
248. Ichim, G. and S.W. Tait, *A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(8): p. 539-48.
249. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
250. Marino, G. and G. Kroemer, *Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure*. Cell Res, 2013. **23**(11): p. 1247-8.
251. Mukherjee, S., *The emperor of all maladies : a biography of cancer*. 1st Scribner trade paperback ed. 2011, New York: Scribner. xviii, 573, 12 p., 8 p. of plates.
252. Brasseur, K., N. Gevry, and E. Asselin, *Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers*. Oncotarget, 2017. **8**(3): p. 4008-4042.
253. Girouard, J., et al., *Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells*. Gynecologic oncology, 2013. **128**(2): p. 335-343.
254. Gagnon, V., et al., *AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(3): p. 785-95.
255. Ali, A.Y., et al., *Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1271**: p. 58-67.
256. Bagnato, A. and L. Rosano, *Understanding and overcoming chemoresistance in ovarian cancer: emerging role of the endothelin axis*. Curr Oncol, 2012. **19**(1): p. 36-8.
257. Chae, Y.K., et al., *Path toward Precision Oncology: Review of Targeted Therapy Studies and Tools to Aid in Defining "Actionability" of a Molecular Lesion and Patient Management Support*. Mol Cancer Ther, 2017. **16**(12): p. 2645-2655.
258. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(1): p. 3-20.
259. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.

260. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara, *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1747-56.
261. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
262. Walczak, H., et al., *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 157-63.
263. Ashkenazi, A., et al., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 155-62.
264. Lane, D., et al., *Acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis in human ovarian cancer cells is conferred by increased turnover of mature caspase-3*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(3): p. 509-21.
265. Khaider, N.G., et al., *Targeted ovarian cancer treatment: the TRAILS of resistance*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(1): p. 75-92.
266. Farooqi, A.A., et al., *Restoring TRAIL mediated signaling in ovarian cancer cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014. **62**(6): p. 459-74.
267. Llobet, D., et al., *The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms*. Eur J Cancer, 2010. **46**(4): p. 836-50.
268. Dolcet, X., et al., *FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis*. Lab Invest, 2005. **85**(7): p. 885-94.
269. Morizot, A., et al., *Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 700-11.
270. Tarragona, J., et al., *DcR1 expression in endometrial carcinomas*. Virchows Arch, 2010. **456**(1): p. 39-44.
271. Liu, X., et al., *Decoy receptor 2 (DcR2) is a p53 target gene and regulates chemosensitivity*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9169-75.
272. Toscano, F., et al., *P53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells*. Oncogene, 2008. **27**(30): p. 4161-71.
273. Zhao, X.D., et al., *Association of EGFR and KRAS mutations with expression of p-AKT, DR5 and DcR1 in non-small cell lung cancer*. Neoplasma, 2017. **64**(2): p. 182-191.

274. Safa, A.R., *c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator*. Exp Oncol, 2012. **34**(3): p. 176-84.
275. Micheau, O., et al., *NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5299-305.
276. Kreuz, S., et al., *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3964-73.
277. Takahashi, R., et al., *A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7787-90.
278. Shiozaki, E.N., et al., *Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 519-27.
279. Scott, F.L., et al., *XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs*. EMBO J, 2005. **24**(3): p. 645-55.
280. Gagnon, V., et al., *Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol*. Apoptosis, 2008. **13**(2): p. 259-71.
281. Van Themsche, C., et al., *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(31): p. 20462-6.
282. Carter, B.Z., et al., *Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3742-50.
283. Vogler, M., et al., *Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells*. Oncogene, 2007. **26**(2): p. 248-57.
284. Jang, B.C., et al., *Leptomycin B-induced apoptosis is mediated through caspase activation and down-regulation of Mcl-1 and XIAP expression, but not through the generation of ROS in U937 leukemia cells*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(2): p. 263-74.
285. Jost, P.J., et al., *XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 1035-9.
286. Lemke, J., et al., *Getting TRAIL back on track for cancer therapy*. Cell Death Differ, 2014. **21**(9): p. 1350-64.
287. Hurteau, J.A., et al., *Randomized phase III trial of tamoxifen versus thalidomide in women with biochemical-recurrent-only epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma after a complete response to first-line platinum/taxane chemotherapy with an evaluation of serum vascular endothelial*

- growth factor (VEGF): *A Gynecologic Oncology Group Study*. Gynecol Oncol, 2010. **119**(3): p. 444-50.
288. Schwartz, P.E., et al., *Tamoxifen in combination with cytotoxic chemotherapy in advanced epithelial ovarian cancer. A prospective randomized trial*. Cancer, 1989. **63**(6): p. 1074-8.
 289. Yokoyama, Y. and H. Mizunuma, *Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy*. World J Clin Cases, 2013. **1**(6): p. 187-90.
 290. Argenta, P.A., et al., *A phase II study of fulvestrant in the treatment of multiply-recurrent epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2009. **113**(2): p. 205-9.
 291. Lindemann, K., et al., *Examestane in advanced or recurrent endometrial carcinoma: a prospective phase II study by the Nordic Society of Gynecologic Oncology (NSGO)*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 68.
 292. Ma, B.B., et al., *The activity of letrozole in patients with advanced or recurrent endometrial cancer and correlation with biological markers--a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(4): p. 650-8.
 293. Kokka, F., et al., *Hormonal therapy in advanced or recurrent endometrial cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(12): p. CD007926.
 294. Battista, M.J. and M. Schmidt, *Fulvestrant for the treatment of endometrial cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2016. **25**(4): p. 475-83.
 295. Covens, A.L., et al., *Phase II study of fulvestrant in recurrent/metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2011. **120**(2): p. 185-8.
 296. Kim, D., et al., *AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 975-87.
 297. Huang, W.C. and M.C. Hung, *Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance*. J Formos Med Assoc, 2009. **108**(3): p. 180-94.
 298. Abedini, M.R., et al., *Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein*. Oncogene, 2010. **29**(1): p. 11-25.
 299. Terakawa, N., Y. Kanamori, and S. Yoshida, *Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer*. Endocr Relat Cancer, 2003. **10**(2): p. 203-8.

300. Li, X., et al., *Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2005. 7(5): p. R589-97.
301. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, *Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment*. Drug Resist Updat, 2008. 11(3): p. 63-76.
302. Liu, W., et al., *[Correlations between the p-Akt-mTOR-p70S6K pathway and clinicopathological features or chemoresistance of ovarian cancer]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2017. 42(8): p. 882-888.
303. Carden, C.P., et al., *The association of PI3 kinase signaling and chemoresistance in advanced ovarian cancer*. Mol Cancer Ther, 2012. 11(7): p. 1609-17.
304. Iwenofu, O.H., et al., *Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy*. Mod Pathol, 2008. 21(3): p. 231-7.
305. Choi, J.I., et al., *Inhibition of Phospho-S6 Kinase, a Protein Involved in the Compensatory Adaptive Response, Increases the Efficacy of Paclitaxel in Reducing the Viability of Matrix-Attached Ovarian Cancer Cells*. PLoS One, 2016. 11(5): p. e0155052.
306. Qiu, Z.X., et al., *The p70S6K Specific Inhibitor PF-4708671 Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Growth*. PLoS One, 2016. 11(1): p. e0147185.
307. Venkatraman, M., et al., *Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis*. Mol Carcinog, 2005. 44(1): p. 51-9.
308. Kim, J.Y., et al., *The relationship between nuclear factor (NF)-kappaB family gene expression and prognosis in triple-negative breast cancer (TNBC) patients receiving adjuvant doxorubicin treatment*. Sci Rep, 2016. 6: p. 31804.
309. Braeuer, S.J., et al., *Constitutively activated nuclear factor-kappaB, but not induced NF-kappaB, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells*. Mol Cancer Res, 2006. 4(10): p. 715-28.
310. Zhang, Q., M.J. Lenardo, and D. Baltimore, *30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology*. Cell, 2017. 168(1-2): p. 37-57.
311. Bai, D., L. Ueno, and P.K. Vogt, *Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt*. Int J Cancer, 2009. 125(12): p. 2863-70.

312. Liu, H., et al., *Regulation of Mcl-1 by constitutive activation of NF-kappaB contributes to cell viability in human esophageal squamous cell carcinoma cells.* BMC Cancer, 2014. **14**: p. 98.
313. Godwin, P., et al., *Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy.* Front Oncol, 2013. **3**: p. 120.
314. Dan, H.C., et al., *Akt-dependent regulation of NF-{kappa}B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK.* Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1490-500.
315. Yang, G., et al., *The biphasic role of NF-kappaB in progression and chemoresistance of ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2181-94.
316. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1978-86.
317. Medema, R.H., et al., *AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1.* Nature, 2000. **404**(6779): p. 782-7.
318. Santo, E.E., et al., *FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma.* Cancer Res, 2013. **73**(7): p. 2189-98.
319. Gao, J., et al., *The involvement of FoxO in cell survival and chemosensitivity mediated by Mirk/Dyrk1B in ovarian cancer.* Int J Oncol, 2012. **40**(4): p. 1203-9.
320. Dansen, T.B. and B.M. Burgering, *Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins.* Trends Cell Biol, 2008. **18**(9): p. 421-9.
321. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.* Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
322. Powell, D.W., et al., *Identification of 14-3-3zeta as a protein kinase B/Akt substrate.* J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21639-42.
323. Danial, N.N., *BAD: undertaker by night, candyman by day.* Oncogene, 2008. **27 Suppl 1**: p. S53-70.
324. Howells, C.C., et al., *The Bcl-2-associated death promoter (BAD) lowers the threshold at which the Bcl-2-interacting domain death agonist (BID) triggers mitochondria disintegration.* J Theor Biol, 2011. **271**(1): p. 114-23.
325. Stickles, X.B., et al., *BAD-mediated apoptotic pathway is associated with human cancer development.* Int J Mol Med, 2015. **35**(4): p. 1081-7.
326. Marchion, D.C., et al., *BAD phosphorylation determines ovarian cancer chemosensitivity and patient survival.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(19): p. 6356-66.

327. Yuan, Z.Q., et al., *AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23432-40.
328. Linnerth-Petrik, N.M., et al., *Akt isoform specific effects in ovarian cancer progression*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 74820-74833.
329. Dummmler, B., et al., *Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 8042-51.
330. Peng, X.D., et al., *Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2*. Genes Dev, 2003. **17**(11): p. 1352-65.
331. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.
332. Yang, Z.Z., et al., *Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(23): p. 10407-18.
333. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 5241-8.
334. Powis, G., et al., *Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase*. Cancer Res, 1994. **54**(9): p. 2419-23.
335. Maira, S.M., et al., *Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1851-63.
336. Davies, B.R., et al., *Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(4): p. 873-87.
337. Santiskulvong, C., et al., *Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2373-84.
338. Oishi, T., et al., *The PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 reduces the growth of ovarian clear cell carcinoma*. Oncol Rep, 2014. **32**(2): p. 553-8.
339. Schrauwen, S., et al., *Dual blockade of PI3K/AKT/mTOR (NVP-BEZ235) and Ras/Raf/MEK (AZD6244) pathways synergistically inhibit growth of primary endometrioid endometrial carcinoma cultures, whereas NVP-BEZ235 reduces*

- tumor growth in the corresponding xenograft models.* Gynecol Oncol, 2015. **138**(1): p. 165-73.
340. Li, J., et al., *The AKT inhibitor AZD5363 is selectively active in PI3KCA mutant gastric cancer, and sensitizes a patient-derived gastric cancer xenograft model with PTEN loss to Taxotere.* J Transl Med, 2013. **11**: p. 241.
 341. Tamura, K., et al., *Safety and tolerability of AZD5363 in Japanese patients with advanced solid tumors.* Cancer chemotherapy and pharmacology, 2016. **77**(4): p. 787-795.
 342. Fischer, U., et al., *The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs.* Cell, 1995. **82**(3): p. 475-83.
 343. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.* Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
 344. Xu, D., et al., *Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database.* Mol Biol Cell, 2012. **23**(18): p. 3677-93.
 345. Pathria, G., C. Wagner, and S.N. Wagner, *Inhibition of CRM1-mediated nucleocytoplasmic transport: triggering human melanoma cell apoptosis by perturbing multiple cellular pathways.* J Invest Dermatol, 2012. **132**(12): p. 2780-90.
 346. Lecane, P.S., et al., *Leptomycin B stabilizes and activates p53 in primary prostatic epithelial cells and induces apoptosis in the LNCaP cell line.* Prostate, 2003. **54**(4): p. 258-67.
 347. Naniwa, J., et al., *Leptomycin B enhances CDDP-sensitivity via nuclear accumulation of p53 protein in HPV-positive cells.* Cancer Sci, 2003. **94**(12): p. 1099-103.
 348. Shao, C., et al., *p53-Dependent anticancer effects of leptomycin B on lung adenocarcinoma.* Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(6): p. 1369-80.
 349. Lu, C., et al., *Chemotherapeutic sensitization of leptomycin B resistant lung cancer cells by pretreatment with doxorubicin.* PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32895.
 350. Turner, J.G., J. Dawson, and D.M. Sullivan, *Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer.* Biochem Pharmacol, 2012. **83**(8): p. 1021-32.
 351. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1.* Exp Cell Res, 1998. **242**(2): p. 540-7.

352. Nguyen, K.T., M.P. Holloway, and R.A. Altura, *The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. **3**(2): p. 137-51.
353. Mutka, S.C., et al., *Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 510-7.
354. Stommel, J.M., et al., *A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking*. EMBO J, 1999. **18**(6): p. 1660-72.
355. Freedman, D.A. and A.J. Levine, *Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7288-93.
356. van der Watt, P.J., et al., *The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation*. Int J Cancer, 2009. **124**(8): p. 1829-40.
357. Menendez, S., et al., *Nuclear export inhibitor leptomycin B induces the appearance of novel forms of human Mdm2 protein*. Br J Cancer, 2003. **88**(4): p. 636-43.
358. Smart, P., et al., *Effects on normal fibroblasts and neuroblastoma cells of the activation of the p53 response by the nuclear export inhibitor leptomycin B*. Oncogene, 1999. **18**(51): p. 7378-86.
359. Hoshino, I., et al., *Combined effects of p53 gene therapy and leptomycin B in human esophageal squamous cell carcinoma*. Oncology, 2008. **75**(1-2): p. 113-9.
360. Cai, X. and X. Liu, *Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 16958-63.
361. El-Guendy, N. and V.M. Rangnekar, *Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases*. Experimental cell research, 2003. **283**(1): p. 51-66.
362. Zhao, Y. and V.M. Rangnekar, *Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(12): p. 1867-74.
363. Shrestha-Bhattarai, T. and V.M. Rangnekar, *Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4*. Oncogene, 2010. **29**(27): p. 3873-80.
364. Sells, S.F., et al., *Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells*. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research, 1994. **5**(4): p. 457-66.

365. Garcia-Cao, I., et al., *Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4*. EMBO Rep, 2005. **6**(6): p. 577-83.
366. Meynier, S., et al., *Role of PAR-4 in ovarian cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(26): p. 22641-52.
367. Jagtap, J.C., et al., *Secretory prostate apoptosis response (Par)-4 sensitizes multicellular spheroids (MCS) of glioblastoma multiforme cells to tamoxifen-induced cell death*. FEBS Open Bio, 2015. **5**: p. 8-19.
368. Tan, J., et al., *Par-4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway-dependent EMT*. Toxicol Lett, 2014. **224**(1): p. 7-15.
369. de Bessa Garcia, S.A., et al., *Prostate apoptosis response 4 (PAR4) expression modulates WNT signaling pathways in MCF7 breast cancer cells: A possible mechanism underlying PAR4-mediated docetaxel chemosensitivity*. Int J Mol Med, 2017. **39**(4): p. 809-818.
370. Kline, C.L., et al., *Delivery of PAR-4 plasmid in vivo via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(19): p. 1831-7.
371. Hebbar, N., et al., *A Naturally Generated Decoy of the Prostate Apoptosis Response-4 Protein Overcomes Therapy Resistance in Tumors*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 4039-4050.
372. Fernandez-Marcos, P.J., et al., *Simultaneous inactivation of Par-4 and PTEN in vivo leads to synergistic NF-kappaB activation and invasive prostate carcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(31): p. 12962-7.
373. Alvarez, J.V., et al., *Par-4 downregulation promotes breast cancer recurrence by preventing multinucleation following targeted therapy*. Cancer Cell, 2013. **24**(1): p. 30-44.
374. Nagai, M.A., et al., *Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer*. Int J Oncol, 2010. **37**(1): p. 41-9.
375. Moreno-Bueno, G., et al., *Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer*. Cancer research, 2007. **67**(5): p. 1927-34.
376. Pruitt, K., et al., *Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23363-70.

377. Chatterton, Z., et al., *Epigenetic deregulation in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Epigenetics, 2014. **9**(3): p. 459-67.
378. Liu, S., et al., *Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling*. Pigment Cell Melanoma Res, 2008. **21**(5): p. 545-58.
379. Sharifi-Zarchi, A., et al., *DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism*. BMC Genomics, 2017. **18**(1): p. 964.
380. Saegusa, M., et al., *Transcriptional regulation of pro-apoptotic Par-4 by NF-kappaB/p65 and its function in controlling cell kinetics during early events in endometrial tumorigenesis*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 26-36.
381. Azmi, A.S., et al., *Selective inhibitors of nuclear export block pancreatic cancer cell proliferation and reduce tumor growth in mice*. Gastroenterology, 2013. **144**(2): p. 447-56.
382. Johnstone, R.W., et al., *A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6945-56.
383. Cheema, S.K., et al., *Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19995-20005.
384. El-Guendy, N., et al., *Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(16): p. 5516-25.
385. Goswami, A., et al., *Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival*. Mol Cell, 2005. **20**(1): p. 33-44.
386. Gurumurthy, S., et al., *Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1146-61.
387. Garcia-Cao, I., et al., *Genetic inactivation of Par4 results in hyperactivation of NF-kappaB and impairment of JNK and p38*. EMBO Rep, 2003. **4**(3): p. 307-12.
388. Chakraborty, M., et al., *Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7255-63.
389. Chaudhry, P., et al., *Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(4): p. 826-39.
390. Sells, S.F., et al., *Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3823-32.

391. Franke, T.F., et al., *The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase*. Cell, 1995. **81**(5): p. 727-36.
392. Kohn, A.D., F. Takeuchi, and R.A. Roth, *Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21920-6.
393. Kennedy, S.G., et al., *The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal*. Genes Dev, 1997. **11**(6): p. 701-13.
394. Ebner, M., et al., *Localization of mTORC2 activity inside cells*. J Cell Biol, 2017. **216**(2): p. 343-353.
395. Milburn, C.C., et al., *Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 531-8.
396. Finocchietto, P., et al., *Control of muscle mitochondria by insulin entails activation of Akt2-mtNOS pathway: implications for the metabolic syndrome*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1749.
397. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression*. Biomol Concepts, 2011. **2**(1-2): p. 1-11.
398. Santi, S.A. and H. Lee, *The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(3): p. C580-91.
399. Yun, S.J., et al., *Differential regulation of Akt/protein kinase B isoforms during cell cycle progression*. FEBS Lett, 2009. **583**(4): p. 685-90.
400. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
401. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
402. Miao, L., et al., *mTORC1 is necessary but mTORC2 and GSK3beta are inhibitory for AKT3-induced axon regeneration in the central nervous system*. Elife, 2016. **5**: p. e14908.
403. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
404. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Regulation of microRNA biogenesis and function*. Thromb Haemost, 2012. **107**(4): p. 605-10.

405. Schetter, A.J., H. Okayama, and C.C. Harris, *The role of microRNAs in colorectal cancer*. Cancer J, 2012. **18**(3): p. 244-52.
406. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
407. Tuschl, T., et al., *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3191-7.
408. Chan, S.P. and F.J. Slack, *microRNA-mediated silencing inside P-bodies*. RNA Biol, 2006. **3**(3): p. 97-100.
409. Liu, J., et al., *A role for the P-body component GW182 in microRNA function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1261-6.
410. Estella, C., et al., *miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization in vitro*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41080.
411. Coffre, M., et al., *miRNAs Are Essential for the Regulation of the PI3K/AKT/FOXO Pathway and Receptor Editing during B Cell Maturation*. Cell Rep, 2016. **17**(9): p. 2271-2285.
412. Xu, M. and Y.Y. Mo, *The Akt-associated microRNAs*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(21): p. 3601-12.
413. McKenna, M.K., et al., *Novel role of prostate apoptosis response-4 tumor suppressor in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2018. **131**(26): p. 2943-2954.
414. Brasseur, K., et al., *Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells*. Oncotarget, 2016.
415. Gurumurthy, S. and V.M. Rangnekar, *Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells*. J Cell Biochem, 2004. **91**(3): p. 504-12.
416. Hebbar, N., C. Wang, and V.M. Rangnekar, *Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4*. J Cell Physiol, 2012. **227**(12): p. 3715-21.
417. Goswami, A., et al., *Par-4 binds to topoisomerase 1 and attenuates its DNA relaxation activity*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6190-8.
418. Asselin, E., G.B. Mills, and B.K. Tsang, *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1862-8.
419. Masters, S.L., et al., *The SPRY domain of SSB-2 adopts a novel fold that presents conserved Par-4-binding residues*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(1): p. 77-84.

420. Filippakopoulos, P., et al., *Structural basis for Par-4 recognition by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins SPSB1, SPSB2, and SPSB4*. J Mol Biol, 2010. **401**(3): p. 389-402.
421. Rape, M., *Ubiquitylation at the crossroads of development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(1): p. 59-70.
422. Diaz-Meco, M.T., et al., *Inactivation of the inhibitory kappaB protein kinase/nuclear factor kappaB pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19606-12.
423. Burikhanov, R., et al., *Chloroquine-Inducible Par-4 Secretion Is Essential for Tumor Cell Apoptosis and Inhibition of Metastasis*. Cell Rep, 2017. **18**(2): p. 508-519.
424. Campo, L., C. Zhang, and E.K. Breuer, *EMT-Inducing Molecular Factors in Gynecological Cancers*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 420891.
425. Li, C.W., et al., *Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1*. Cancer Res, 2012. **72**(5): p. 1290-300.
426. Delaleau, M. and K.L. Borden, *Multiple Export Mechanisms for mRNAs*. Cells, 2015. **4**(3): p. 452-73.
427. Green, D.R. and G. Kroemer, *Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1127-30.
428. Watanabe, M., et al., *Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast*. Genes Cells, 1999. **4**(5): p. 291-7.
429. Kigawa, J., *New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer*. Yonago Acta Med, 2013. **56**(2): p. 43-50.
430. Searle, E.J., et al., *Akt inhibition improves long-term tumour control following radiotherapy by altering the microenvironment*. EMBO Mol Med, 2017. **9**(12): p. 1646-1659.
431. Dear, R.F., B. Gao, and P. Harnett, *Recurrent ovarian cancer: treatment with pegylated liposomal doxorubicin; a Westmead Cancer Care Centre experience*. Asia Pac J Clin Oncol, 2010. **6**(1): p. 66-73.
432. Volgger, B., et al., *Carboplatin and nonpegylated liposomal doxorubicin in primary advanced or recurrent endometrial cancer: a phase 2 trial conducted by AGO Austria*. Int J Gynecol Cancer, 2015. **25**(2): p. 257-62.

433. Temkin, S.M. and G. Fleming, *Current treatment of metastatic endometrial cancer*. Cancer Control, 2009. **16**(1): p. 38-45.
434. Makker, V., et al., *Treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma with doxorubicin in patients progressing after paclitaxel/carboplatin: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience from 1995 to 2009*. Int J Gynecol Cancer, 2013. **23**(5): p. 929-34.
435. Furedi, A., et al., *Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer*. J Control Release, 2017. **261**: p. 287-296.
436. Smith, J.A., et al., *Equivalency challenge: Evaluation of Lipodox(R) as the generic equivalent for Doxil(R) in a human ovarian cancer orthotropic mouse model*. Gynecol Oncol, 2016. **141**(2): p. 357-363.
437. Moxley, K.M. and D.S. McMeekin, *Endometrial carcinoma: a review of chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents*. Oncologist, 2010. **15**(10): p. 1026-33.
438. Burikhanov, R., et al., *The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis*. Cell, 2009. **138**(2): p. 377-88.
439. Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge, *Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction*. Cell, 2009. **136**(5): p. 823-37.
440. Bose, C.K., *Emil "Tom" Frei III, MD (1924-2013)*. Indian J Med Paediatr Oncol, 2014. **35**(1): p. 111-6.
441. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8643-53.
442. Tsherniak, A., et al., *Defining a Cancer Dependency Map*. Cell, 2017. **170**(3): p. 564-576 e16.
443. Jarroux, J., A. Morillon, and M. Pinskaya, *History, Discovery, and Classification of lncRNAs*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1008**: p. 1-46.

ANNEXE A

EXPRESSION, ACTIVATION, AND ROLE OF AKT ISOFORMS IN THE UTERUS

François Fabi et Eric Asselin

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Reproduction* le 12 août 2014. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs.

4.1 Contribution des auteurs

François Fabi a écrit la totalité du manuscrit. Eric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et a supervisé l'élaboration du manuscrit.

4.2 Résumé de l'article (français)

Les trois isoformes d'Akt, à savoir Akt1, Akt2 et Akt3, sont des protéines régulatrices charnières de plusieurs processus biologiques, autant physiologiques que pathologiques. Chacun de ces isoformes exhibe un niveau d'homologie et de redondance fonctionnelle appréciable; toutefois, nonobstant cette similitude structurelle, une quantité de données importante suggèrent que ces protéines semblables possèdent des cibles spécifiques et singulières en plus de présenter des localisation intra-cellulaire distinctes. Une grande quantité d'information est disponible quant au rôle d'Akt dans les processus reproductifs mais de fortes lacunes subsistent dans le contexte des fonctions spécifiques de chacun des isoformes. Cette revue de littérature se penchera donc sur les rôles des isoformes d'Akt dans l'utérus en se concentrant sur les processus de prolifération et de mort cellulaire, mécanismes qui régissent l'implantation embryonnaire, la décidualisation, l'endométriose et le cancer endométrial. Il apparaît capital de mieux comprendre les

fonctions précises qu'occupent les isoformes d'Akt dans les mécanismes moléculaires utérins et d'ainsi expliciter leur position dans la régulation des processus physiologiques et l'émergence des divers maladies gynécologiques.

4.3 Article complet (anglais) :

Abstract

The three isoforms of AKT: AKT1, AKT2, and AKT3, are crucial regulators of both normal and pathological cellular processes. Each of these isoforms exhibits a high level of homology and functional redundancy with each other. However, while being highly similar and structurally homologous, a rising amount of evidence is showing that each isoform possesses specific targets as well as preferential subcellular localization. The role of AKT has been studied extensively in reproductive processes, but isoform-specific roles are yet to be fully understood. This review will focus on the role of AKT in the uterus and its function in processes related to cell death and proliferation such as embryo implantation, decidualization, endometriosis, and endometrial cancer in an isoform-centric manner. In this review, we will cover the activation of AKT in various settings, localization of isoforms in subcellular compartments, and the effect of isoform expression on cellular processes. To fully understand the dynamic molecular processes taking place in the uterus, it is crucial that we better understand the physiological role of AKT isoforms as well as their function in the emergence of diseases.

Introduction

AKT, a serine/threonine kinase, is widely studied in a plethora of biological phenomenon. It has emerged as one of the most critical regulators of cell fate considering its implication in cell cycle control, apoptosis evasion, and metabolic processes, among others. This versatile serine–threonine kinase is central to many human physiological processes; however, because of its fundamental role in many signaling pathways, gain of function of AKT is linked to multiple human diseases. This review focuses on the role of AKT in both normal and pathological processes in the uterus.

The uterus is composed of two major linings; the endometrial and myometrial linings. This review will focus on the former, as it is the compartment that undergoes the most drastic changes throughout the menstrual cycle and pregnancy. The endometrium is further subdivided in two layers: the functional layer and the basal layer. While the basal layer role is to spawn and subsequently support its counterpart, the functional layer is periodically built during every menstrual cycle; this process, the purpose of which is to prepare the endometrium to the possible implantation of a fertilized egg, is influenced by a plethora of factors. The successful implantation of the embryo relies on a highly coordinated interaction between the maternal endometrium and the invading trophoblast. This tightly restricted period of receptivity, which recurs every cycle, is known as the 'window of implantation' and requires a very dynamic regulation of expression of several genes (Kao et al. 2002, Sharma & Kumar 2012); various mechanisms, which we will explain elaborately further in this review, allow fruitful implantation to take place. The uterus is also involved in many pathological conditions; endometriosis and uterine cancer, the two most prominent of these diseases, will be addressed in this review. Considering the growing body of evidence establishing AKT as a fundamental regulator of many cytokine- and hormone- driven processes, it is natural to study its involvement in the aforementioned processes and mechanisms.

The AKT protein family is constituted by three different isoforms; each of those isoforms is produced by a specific gene. The three distinct isoforms are AKT1/PKBa, AKT2/PKBb, and AKT3/PKBg; each of those isoforms presents a highly homologous sequence to each other, both functionally and structurally (Fig. 1; Liao & Hung 2010). The overwhelming body of evidence existing on AKT functions concerns its role in cell survival processes, apoptosis evasion, and cell proliferation (Hennessy et al. 2005, Manning & Cantley 2007). The cytosolic and inactive form of AKT is recruited to the plasma membrane through phosphorylation of phosphoinositides (PtdIns) at the 3-position of the inositol ring by phosphoinositide 3-kinase (PI3K), subsequently producing PtdIns3P/PIP, PtdIns(3,4)P2/PIP₂, and ultimately PtdIns(3,4,5)P3/PIP₃. This phospholipid is anchored in the plasma membrane and will subsequently activate the

downstream signaling component by specific binding. Many of those proteins harbor the pleckstrin homology (PH) domain, which recognizes and binds to distinct phosphorylated PtdIns (Lemmon 2007). The presence of the PH domain can therefore be considered crucial to both activation and localization of proteins displaying it. AKT is one such protein; its PH domain binds specifically to PIP3, recruiting and anchoring it to the plasma membrane. It must be noted that some evidences demonstrate that AKT can bind to PIP3 as well as PIP2, as revealed by its crystalline structure as well as in vitro experiments (Franke et al. 1997, Thomas et al. 2002); however, full activation of AKT requires PIP3 (Frech et al. 1997, Denley et al. 2009, Kamimura & Devreotes 2010). Besides locating it to the plasma membrane, the binding of PIP3 alters the conformation of AKT. This enables its activation by various kinases also present at the membrane by phosphorylation of two crucial residues. The first member of this network is the 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), which also displays a PH domain (Mora et al. 2004, Raimondi & Falasca 2011). PDK1 will activate AKT by phosphorylating its catalytic domain's threonine residue (T308 for AKT1, T309 for AKT2, and T305 for AKT3; Liao & Hung 2010). On the other hand, the mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2, is the long-sought second major activator of AKT (Sarbasov et al. 2005). It directly phosphorylates the serine residue (S473 for AKT1, S474 for AKT2, and S472 for AKT3). This double phosphorylation fully activates AKT (Yang et al. 2002). One of the most crucial negative regulators of these processes is the lipid protein phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN), which antagonizes AKT activation by catalyzing the dephosphorylation of PIP3, transforming it into PIP2.

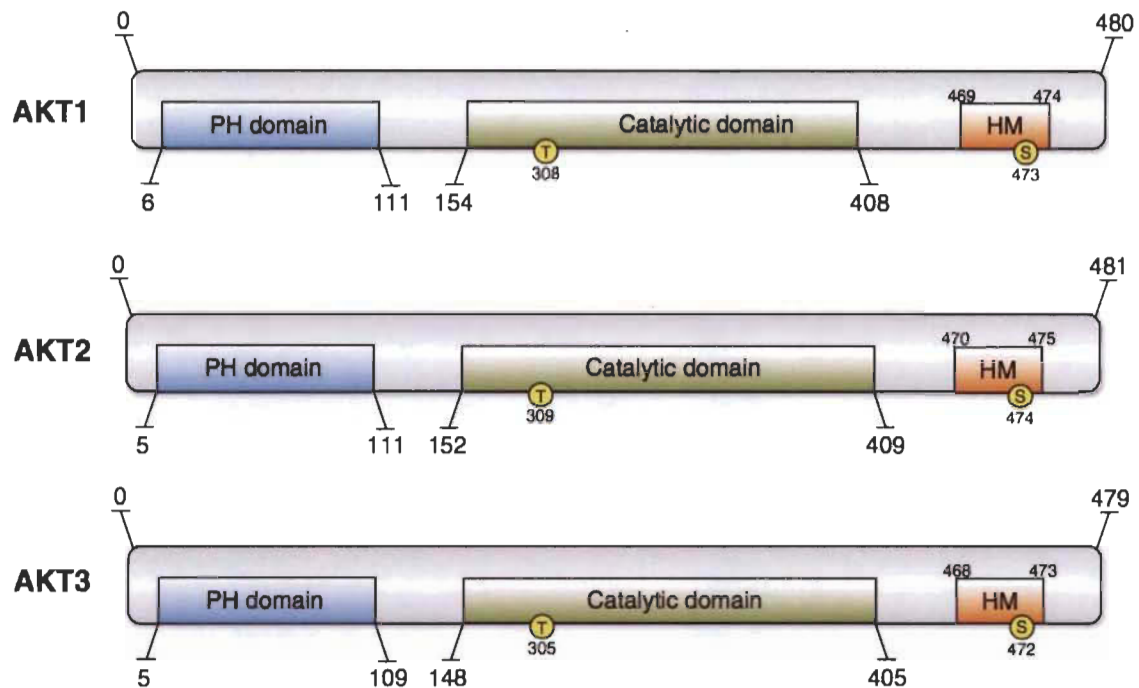


Figure 1 **Structure of AKT isoforms**

Schematic representation of each AKT isoform with its pleckstrin homology domain (PH domain), its catalytic domain, and its hydrophobic motif. The location of major phosphorylated residues (either T for threonine or S for serine) is also shown. Latest (as of May 2014) RefSeq NCBI protein sequence were used (NP_001014431.1, NP_001617.1, and NP_005456.1 respectively).

This reduces AKT localization to the membrane, its conformational changes, and its availability for interaction with its activators (Song et al. 2012). Studies have shown that AKT can be transported to various cellular compartments and organelles. The mechanisms mediating this translocation are still vastly misunderstood. However, the importance of AKT localization in cellular processes, as well as the mechanisms regulating its translocation, is being documented. Recent studies have shown that AKT1 and AKT2 preferentially localized to the cytosol; however, AKT2 was found to colocalize to the mitochondria, suggesting a role in mitochondrial-induced apoptosis as well as metabolism. Finally, AKT3 was found to localize predominantly to the nucleus. These findings emphasize the need to reassess the dogma of plasma membrane activation of AKT (Gonzalez & McGraw 2009, Santi & Lee 2010).

Many studies focus on the overall role of AKT, without regards to isoform specificities; indeed, a growing amount of data show that despite the high homology found between isoforms and their resulting functional redundancy, isoforms display specific actions and have distinct roles in both normal and pathological phenomena. To understand these individual roles, many groups have endeavored to generate transgenic mice deficient in each isoforms. Akt1-deficient mice exhibited an increased neonatal mortality as well as a reduced body mass (Chen et al. 2001, Cho et al. 2001a); Akt2-deficient mice developed diabetes-like syndrome, slightly reduced body mass, but no major birth defects (Cho et al. 2001b, Garofalo et al. 2003); finally, Akt3-deficient mice exhibited reduced brain size due to reduced cell size and number, but did not develop glucose metabolism disorders nor body mass reduction (Easton et al. 2005, Tschopp et al. 2005). Considering the results obtained by these studies, it is evident that AKT isoforms exhibit functional redundancy, as well as non-redundant physiological activities. To further assess these differences, the next natural step was to generate double-knockout animals. Mice with combined deficiencies of both Akt1 and Akt2 displayed majorly impaired skin, bone, and muscle development and severely impeded adipogenesis, and died shortly after birth (Peng et al. 2003). Both Akt1 and Akt3 knockout mice died approximately at embryonic day 12 due to defects in growth as well as flawed cardiovascular and nervous system development (Yang et al. 2005). Finally, both Akt2- and Akt3-deficient mice exhibited impaired glucose metabolism, reduced body mass as well as reduced testis and brain weight; despite these defects, however, they were viable and healthy (Dummler et al. 2006). The study also demonstrated that heterozygous mice possessing a single Akt1 at the exclusion of any other isoforms (Akt1C/K, Akt2K/K, and Akt3K/K) were viable; this strongly suggests that a single functional allele of Akt1 is sufficient for the mice to develop normally and thrive. Taken together, these findings indicate that each isoform possesses non-overlapping functions that need to be elucidated to further understand the dynamic and multiple processes in which AKT is involved. This review will focus on the role of AKT isoforms in processes such as implantation, decidualization, endometriosis, and endometrial cancer (EC; Fig. 2).

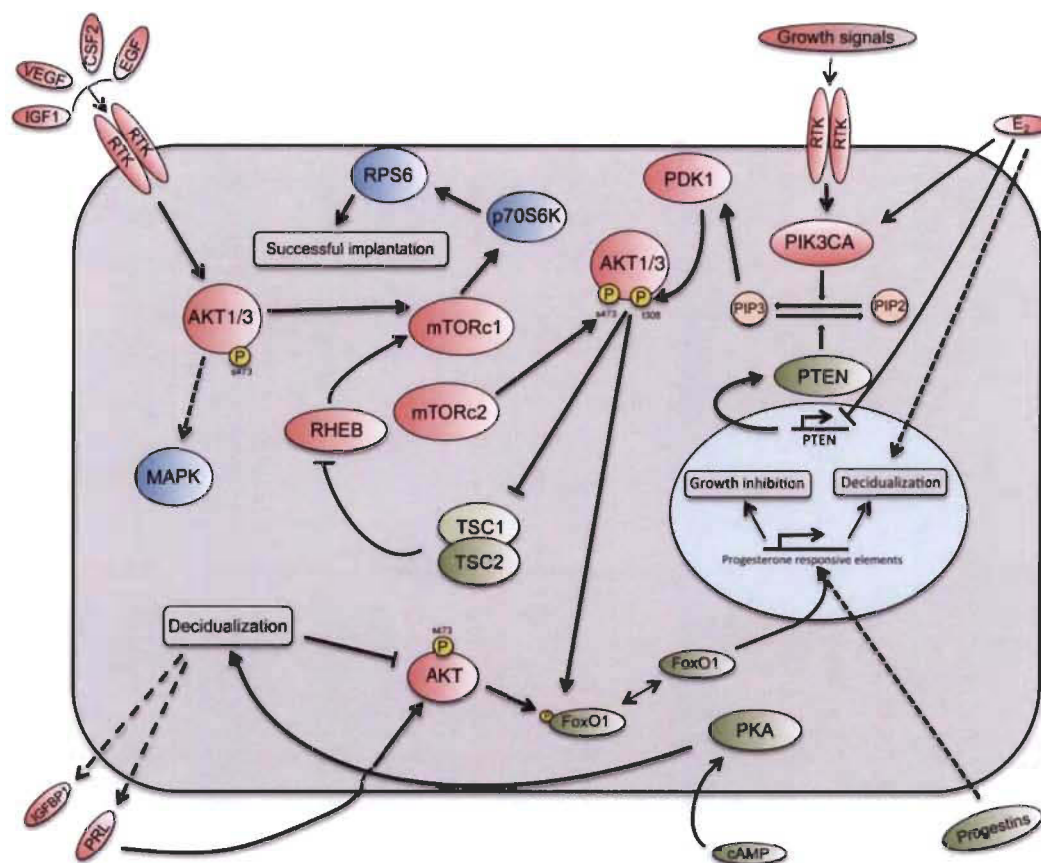


Figure 2 Overview of AKT signaling in the uterus.

Schematic representation of crucial regulation elements involving AKT in various physiological and pathological contexts. Green background indicates tumor suppressor proteins, whereas red background denotes potential oncogenes.

Implantation

The implantation process, by which the embryonic trophoblast invades the maternal uterine luminal epithelium, necessitates a highly coordinated interaction between endometrial cells and trophoblastic cells. This mechanism allows the invading blastocyst to penetrate into the endometrial stroma to eventually come into contact with the maternal blood supply. First, trophoblastic cells of the trophoblast will be exposed to the maternal endometrium; chemokines and cytokines will enable a molecular dialog between the two structures which will enable the docking and tethering of the embryo to the endometrium, not unlike leukocyte extravasation or metastatic invasion (van den Brule et

al. 2005). The trophoblast will then invade the endometrium by penetrating into both the endometrial epithelial cells and its basement membrane; this penetration is enabled by the selective apoptosis of the endometrial epithelial cells (Gu et al. 1994). The invading trophoblast will then come into contact with the endometrial stroma, the uterine blood vessels, and the inner myometrium; the establishment of the placenta and the uteroplacental circulation will conclude this process.

In vitro experiments involving cultured blastocysts from superovulated mice demonstrated that they expressed AKT1 and AKT2 as well as phosphorylated AKT (S473), both majorly at the plasma membrane. The preimplantation embryos also displayed increased phosphorylated AKT (S473) as well as increased glucose uptake in response to insulin, an effect that was mitigated by Wortmannin as well as LY-294002 (both potent PI3K inhibitors) (Riley et al. 2005). This suggests that AKT is necessary for blastocysts' basic glucose metabolism, making it crucial for proper implantation in the maternal endometrium.

In a recent study, the use of cytotrophoblastic SGHPL-5 cells exhibiting features of invasive trophoblast cells that were stably transfected with shRNAmir directed against all three AKT isoforms was discussed. This experiment suggested that AKT1 and AKT3 enable trophoblast migration in response to EGF; however, none of the AKT isoforms seemed to be involved in trophoblast cell proliferation. These effects could be explained by the abrogation of EGF-induced mTORC1 phosphorylation in the absence of both AKT1 and AKT3 (Haslinger et al. 2013). Furthermore, we have shown that each isoform is expressed during both the pregnancy and the pseudo- pregnancy of the rat. However, we have evidenced that AKT3 was the only phosphorylated isoform at the time of implantation, further strengthening the idea that specific isoforms exert tight control on specific mechanisms (Veillette et al. 2013). However, as stated previously, double knockout mice for Akt2 and Akt3 did not display any birth defect except reduced body mass; the mild phenotype was not influenced by a compensatory expression of AKT1, suggesting that AKT1 and AKT3 possess a similar function in implantation processes (Dummler et al. 2006). This hypothesis is reinforced by the fact that Akt1- and Akt3-

deficient mice were embryonically lethal because of improper placental vasculature, whereas Akt1 and Akt2 double-knockout mice abnormalities were more developmental in nature (Peng et al. 2003, Yang et al. 2005).

Descriptive studies using human placentas have shown that all three AKT isoforms were expressed in first trimester villous and extravillous cytotrophoblasts as well as villous fibroblasts; the syncytium, however, displayed only AKT3 expression. Isoform localization was also variable: AKT1 was detectable primarily not only in the cytoplasm of both villous and extravillous cytotrophoblasts but also in the nuclei, although at a lower level; AKT2 was expressed exclusively in the cytoplasm; AKT3 was most prominent in the nuclei of cells. Experiments using SGHPL-5 cells confirmed these observations (Haslinger et al. 2013). It has also been demonstrated that chorionic gonadotropin, a hormone secreted by the syncytiotrophoblast, promoted trophoblast invasion through AKT-dependent upregulation of

MMP2 as well as increased motility. These effects were not dependent on increased cell proliferation (Prast et al. 2008). Another set of experiments, performed in mice at 5 days of pregnancy, revealed that implantation sites displayed increased PIK3CA, AKT, and RHOA expression, whereas inter-implantation site displayed increased PTEN expression; AKT was most strongly expressed in the stromal cells and luminal epithelium of the implantation site, while phosphorylated AKT (S473) was strongly expressed in stromal cells of the implantation site (Liu et al. 2014). Additionally, the use of contralateral intrauterine injection of LY294002 drastically reduced the number of implanted embryos. These results suggest that the phosphorylation of AKT is important in the process of implantation. Furthermore, these results were not observed when using pseudopregnant mice, allowing us to think that the crosstalk between endometrium and embryo is important in this process. In contrast to these observations, death effector domain-containing protein (Dedd)K/K mice implantation sites exhibited decreased AKT protein levels, accompanied by a structural disintegration of the sites and implantation failures; forced expression of AKT1 partially restored ploidy of the decidual cells, an important marker of successful decidualization, and thus, receptive endometrium (Mori et

al. 2011). AKT has also been shown to regulate endometrial cell migration in response to chemoattractants (PDGF-BB, EGF, and FGF2) as well as 17 β -estradiol (E2), further cementing AKT role in the dynamic process of decidualization (Gentilini et al. 2007). In farm animals, a very recent report has shown that IGF1 provided a crucial stimulatory signal in primary porcine trophectoderm cells (pTr), through the PI3K/Akt pathway. The study evidenced rapid activation of AKT1 upon IGF1 administration, followed by RPS6 activation, a downstream target of mTOR acting as a protein synthesis regulator. The results also suggested that the ERK1/2 MAPK pathway is dependent upon the activation of PI3K/Akt in this context (Jeong et al. 2014a). Another recent report concerning porcine implanting embryos suggested that vascular endothelial growth factor (VEGF; a signal protein capable of stimulating angiogenesis as well as acting as a growth factor), secreted by the receiving endometrium as well as the implanting conceptus, is responsible for the increased migration and proliferation of pTr cells through the concomitant activation of the PI3K/Akt and MAPK pathways. Again, VEGF induced rapid activation of AKT1 as well as RPS6; this activation was dependent upon PI3K activity as well as mTOR and MAPK activity, as shown by the pharmacological inhibition experiments the authors conducted (Jeong et al. 2014b). Finally, colony-stimulating factor 2 (CSF2), a critical cytokine responsible for proliferation and differentiation of granulocytes and macrophages, is also suggested as an activator of the PI3K/Akt pathway. CSF2 levels were highly enriched during day 10 to day 14 in the pregnant porcine endometrium; using pTr cells, CSF2 has also been shown to activate the PI3K/Akt pathway, the MAPK pathway and, ultimately, RPS6 through mTOR activation (Jeong et al. 2014c). All the above-mentioned studies report that ERK1/2 activation was dependent upon AKT1 activation. It should also be noted that, in the porcine context, CSF2 is thought to be secreted in response to conceptus-derived estrogens. Similarly, heightened levels of CSF2 are also found in the bovine uterus during the peri-implantation period through the action of interferon tau (IFNT; Emond et al. 2000, Michael et al. 2006); conversely, the ovine uterus secretes CSF2 during the same period, which in turn enhances IFNT secretion by the trophoblast (Imakawa et al. 1993). These results suggest that regulation of the PI3K/Akt and MAPK pathways by CSF2 could be relevant to other species. Taken together, these results suggest that implantation mechanisms depend on a highly coordinated crosstalk

between the PI3K/Akt and MAPK pathways, resulting in the pivotal activation of the mTOR pathway. Both of these networks are thus hypothesized to be crucial in the establishment of reciprocal communication between the implanting embryo and the receiving endometrium.

Decidualization

During each reproductive cycle, the endometrium undergoes extensive and crucial transformations. The window of receptivity required for implantation to occur is narrow; the endometrium needs to be aptly prepared for implantation through the intricate process of decidualization. Decidualization is initiated through the activation of the cAMP pathway (Gellersen & Brosens 2003) by the binding of various ligands to a G protein-coupled heteromeric receptor, inducing the production of cAMP in the endometrial stromal cells. Endocrine signaling such as E2 or progesterone are both capable of inducing decidualization by their own. However, the occurrence of decidualization is considerably delayed (Brar et al. 1997, Brosens et al. 1999), when these hormones act without concomitant cAMP signaling; priming by cAMP signaling can thus be considered vital to endometrial cell sensitivity to progesterone.

This process is characterized by extensive differentiation and profound changes in cell function. The most critical change observed in this transformation is the transition of endometrial stromal fibroblasts to secretory, glycogen-filled, epithelial-like cells. This change is accompanied by the secretion of various proteins such as prolactin (PRL) as well as insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1). PRL has been shown to be an inhibitor of apoptosis in various tissues (Al-Sakkaf et al. 2000, Gado et al. 2002, Krishnan et al. 2003) as well as an increasingly relevant tumor biomarker in gynecological cancers (Asai-Sato et al. 2005, Levina et al. 2009). The antiapoptotic effects of PRL on decidual cells also appear to be AKT dependent. The PRL pathway exerts its survival effect through the activation of both MAPK and PI3K (Rao et al. 1995, Yamauchi et al. 1998), and thus, AKT. Additionally, PRL has been shown to induce phosphorylation of Akt (Ser473) as well as its transit from the cytoplasm to the nuclear compartment (Tessier et al. 2001). The role of AKT in decidualization is still vastly unclear and under

investigation by various groups. Cultured human endometrial stromal cells undergoing decidualization through estrogen and progesterone supplementation were shown to exhibit a lowered level of phosphorylated AKT (Ser473), indicating that the phosphorylation of AKT might inhibit this process (Yoshino et al. 2003). Interestingly, this inhibition did not appear to be hormone dependent but cAMP dependent. We have also previously shown that both TGF β 2 and TGF β 3 could decrease AKT phosphorylation (S473) in rat decidual cells, further involving the decrease in activated AKT with the decidualization process (Caron et al. 2009). Finally, DeddK/K mice were reported to exhibit reduced decidual cell polyploidy probably due to lowered AKT stability; forced expression of AKT1 partially rescued the phenotype (Mori et al. 2011).

It has been demonstrated that the cAMP pathway is necessary in both the initiation and the maintenance of decidualization (Brosens et al. 1999, Tierney et al. 2003), through the activation of various signaling pathways. Insulin, IGF1, and IGF2 have been found to induce the phosphorylation of AKT (S473) in decidualized cells (Capp et al. 2011). On the other hand, decidualization has been linked to the reduced level of phosphorylated AKT and we demonstrated that phosphorylation of all three AKT isoforms is reduced during decidualization (Grenier K and Asselin E, unpublished work; Yoshino et al. 2003); incidentally, both MPA and progestins have been shown to reduce AKT phosphorylation. This reduction has been shown to be responsible for the increased FoxO1 translocation to endometrial stromal cell nuclei. This effect can be explained by the inhibition of AKT-dependent phosphorylation of FoxO1 which usually results in its cytoplasmic sequestration (Labied et al. 2006, Zhang et al. 2011). As FoxO1 is of crucial importance in the regulation of progesterone response in endometrial cells (Chen et al. 2011, Kajihara et al. 2013), it is plausible that the modulation of AKT activity is of crucial importance in the establishment of decidualization. AKT is further involved in the decidual cell response to progesterone by stimulating the expression of RRM2, a rate-limiting enzyme in the deoxynucleotide production for DNA synthesis, which could induce the characteristic cell proliferation found during mice decidualization (Lei et al. 2012). However, the specific mechanisms by which each AKT isoform acts in the process of decidualization remain yet to be elucidated.

The dichotomy between cAMP and PRL pathway effects on AKT activity in the decidualization process remains yet to be elucidated; it is possible that an overall reduction of phosphorylated AKT has been observed because of its preferential localization to the nucleus at the exclusion of other compartments. In this context, the reduced amount of total AKT would not equate to lowered activity; the concentrated levels of AKT could signal in the nucleus despite cytosolic presence. Furthermore, as the effect of nuclear AKT is vastly unclear, we hypothesize that specific AKT isoforms, displaying distinct cellular sublocalization, possess differential targets and activation pathways.

Endometriosis

Endometriosis is a very common gynecological disorder, which is estrogen dependent as well as inflammatory in nature, prevalent in 10–15% of reproductive aged women (Olive & Pritts 2001). This disease is associated with chronic pelvic pain as well as infertility. The ectopic endometrial implants can be found most commonly on the ovaries, in the Pouch of Douglas, on the uterus, and in the fallopian tubes. The most widely accepted pathogenesis mechanism is a retrograde flow of menses, which would deposit still viable endometrial cells at anomalous locations; this process requires the endometrial cells to attach to the peritoneal mesothelial cells and establish vasculature to permit their proliferation (Sampson 1927, Nunley & Kitchin 1980, D’Hooghe 1997, Macer & Taylor 2012, Sundqvist et al. 2012). It is clear, however, that molecular mechanisms are integral in the disease as retrograde menstruation is common (Lucidi et al. 2005).

It has been shown before that the PI3K/Akt signaling pathway is abnormally activated during endometriosis and that this activation was partly responsible for the endometriotic cells’ reduced decidual response (Matsuzaki et al. 2005, Cinar et al. 2009); serial analysis of gene expression revealed an increased level of both PI3K and phosphorylated AKT (S473) in endometriotic tissues, probably through the enhanced expression of GAS6, AXL, and ACTN4, responsible for enhanced proliferation and motility (Honda et al. 2008). On the other hand, AKT was not involved in endometriotic cells’ expression of EMT markers in response to TNF α , a crucial component of inflammation in this disease

(Berkkanoglu & Arici 2003, Grund et al. 2008). Another study highlighted the link between high levels of phosphorylated AKT (S473) and increased Survivin expression, suggesting that Akt permits cell survival and apoptosis avoidance (Zhang et al. 2009). According to its hormone-driven nature, E2 was shown to promote endometriotic cell proliferation through the reduced expression of PTEN and the subsequent activation of AKT (Zhang et al. 2010).

Recent studies using high-throughput methods have shown that AKT1 expression was highly elevated in early stages of endometriosis while moderate in later stages of the disease. Higher expression of AKT1 was also linked to dramatically reduced fertility in normal patients. AKT1 was noted to be overwhelmingly located in the cytoplasm of both glandular and stromal cells (Laudanski et al. 2009). Interestingly, studies have linked endometriosis to infertility due to progesterone resistance and failure of endometrial cells to properly decidualize (Bulun et al. 2006). As AKT activation is a hallmark of endometriosis and the inhibition of PI3K and AKT allowed for increased response to MPA and cAMP, it is possible that AKT plays a role in this process; abrogating AKT phosphorylation may reinstate normal localization of FoxO1 and allow for proper decidualization, enhancing fertility of endometriosis stricken women (Engelman 2009, Samartzis et al. 2013).

Increased and decreased expression of phosphorylated AKT (S473) is usually concomitant with similar changes in the activity of mTORc1, leading us to think that one of the primary effects of AKT in endometriosis is the activation of the mTOR pathway (Lucidi et al. 2005, Honda et al. 2008, Zhang et al. 2009). The NFkB pathway also seems to be entwined in the hormonal response as well as survival mechanisms in which AKT is involved (Grund et al. 2008, Zhang et al. 2010, Capp et al. 2011). It seems highly plausible that these proteins are all part of a complexly intertwined signaling network as links have been extensively demonstrated among the mTOR complex, the PTEN/PI3K/Akt axis, and the NFkB signaling pathway.

Cancer

Multiple malignant tumors can develop in the uterus. However, considering that EC is the most common gynecological malignancy in North America, it will be the focus of this section of the review. Multiple risk factors are linked to the development of this type of tumors, namely obesity, use of tamoxifen adjuvant therapy for the treatment of breast cancer, a family history of polycystic ovarian syndrome, nulliparity, and increased age; 95% of cases will occur in women aged over 40 years. These risk factors are also distinctly linked to each subtype of EC; this will briefly be discussed further in this section (Arora & Quinn 2012).

EC is usually detected at early stages, enabling prompt and effective treatments using a combination of surgery, radiotherapy, and chemotherapy; however, more than 25% of primary endometrial tumors exhibit metastasis at the moment of detection. This aggressive subtype of tumors presents the most important therapeutic challenge, as they are disseminated and frequently chemoresistant (Muss 1994, Humber et al. 2007). Endometrial carcinomas are generally classified following Bokhman's categorization specifying two major types of endometrial carcinomas, type 1 and type 2 tumors (Bokhman 1983). Type 1 malignancies are generally adenocarcinomas of endometrioid nature and represent the wide majority of endometrial tumors (w80%); they usually arise in younger perimenopausal women displaying an atypical hyperplasia, are linked to the presence of high levels of estrogens, and do not display highly invasive phenotypes. Type 2 tumors, however, regroup clear cell, squamous, and undifferentiated carcinomas (Ko et al. 2014). These various diseases do not share the risk factors associated with type 1 tumors and present a very bleak prognosis. Finally, while type 2 tumors are often associated with TP53 mutations, type 1 tumors are overwhelmingly associated with PTEN/PI3K pathway mutations (Bansal et al. 2009, Wild et al. 2012). Increased activity of the AKT/PI3K/ mTOR pathway has also been shown to be linked to poor prognosis, regardless of the histological type (Salvesen et al. 2009). Considering its larger incidence and the scope of this review, we will focus thereafter on type 1 EC.

Considering the very high proportion of ECs displaying PTEN and PI3K mutations, we are allowed to think that the PI3K/PTEN/Akt axis is of primordial importance in the initiation of the disease (Fig. 3). However, recent data obtained from high-throughput

mass spectroscopy and RPPA approaches revealed that Akt1 was mutated in only 1% of ECs, while no mutation hotspots were detected for both Akt2 and Akt3. This suggests that AKT's effect in EC initiation and progression does not emerge from gain-of-function mutations but rather from the activation of upstream proteins. However, while the great majority of ECs display multiple mutations in the PI3K/PTEN/Akt pathway, mutation in Akt1 has been demonstrated to be sufficient for oncogenic transformation (Shoji et al. 2009).

Progesterone has been long known as a crucial antagonist of EC progression through a variety of mechanisms, notably through cell cycle arrest and apoptosis induction (Yang et al. 2011). However, progestin resistance is a major hurdle in the treatment of EC. The PI3K/Akt pathway has been shown to be activated in progesterone receptor (PGR)-deficient cell lines following MPA treatments, an effect that was reversed when reinstating PGR expression. These data suggest that the loss of PGR could potentially induce progesterone-induced apoptosis resistance and instead promote a PGR-independent, Akt-driven survival pathway (Gu et al. 2011). Further data have confirmed AKT involvement in this pathway; the use of MK-2206, a novel AKT inhibitor, has been shown to increase progestin response in EC (Pant et al. 2012). On the other hand, estrogen is of prime importance in the development of EC; its unopposed use is a primary risk factor of this disease. Evidences have shown that E2 induced the phosphorylation of AKT (S473) through PI3K as well as estrogen receptor alpha (ERα; Guo et al. 2006). Furthermore, loss of PTEN has been shown to activate AKT, which in turn is responsible for the phosphorylation of ERα on S167; this phosphorylation subsequently activates it (Vilgelm et al. 2006).

The histogram shows the frequency of mutations, deletions, amplifications, and multiple alterations in endometrial cancer. An exceedingly high number of tumors display mutations in one of the five genes studied. The histogram was generated using cBioPortal and is produced from 69 distinct studies.

As stated previously, chemoresistance is a major challenge in the treatment of EC. Studies using chemoresistant cell lines and RNAi have been conducted to assess the effect of individual AKT isoforms on drug resistance. Results have shown that while all three isoforms were necessary for optimal cell proliferation, apoptosis evasion, and cell survival, AKT2 was most crucial in chemoresistance (Girouard et al. 2013); this is in accordance with previous studies which suggested that elevated AKT2 activation following cisplatin treatment was responsible for Bcl2 activation and reduced apoptosis (Rouette et al. 2012). Finally, we have previously shown that AKT regulates PTGS2 expression in EC through the activation of the NFkB pathway; this, in turn, enables

enhanced angiogenesis, tumor invasive- ness, and potentially chemoresistance (St-Germain et al. 2004a,b, Chaudhry & Asselin 2009).

The role of nuclear AKT in cancer has not been extensively investigated as yet. Furthermore, studies showing a link between nuclear accumulation of AKT and cancer progression have been focused on pan-AKT, without regard to isoform specificity (Martelli et al. 2012). Using tissue microarrays, we have recently demonstrated that the nuclei of normal endometrial cell were highly enriched with AKT3, as well as AKT1, albeit at a reduced level; this nuclear enrichment was inverted, with AKT1 being the predominant isoform at the nucleus, upon grade progression of endometrial carcinomas; nuclear localization of AKT was altogether abrogated at a high grade. We could not detect nuclear AKT2 (Fabi F and Asselin E, 2014, results not shown). These results suggest that localization of AKT isoforms may be involved in grade progression of ECs; the nuclear exclusion of AKT3 might lead to dysregulation of normal signaling cascades while the nuclear localization of AKT1 could induce abnormal growth and migratory signals.

Conclusion

In this review, we have highlighted the major known roles in various reproductive and pathological processes involving AKT isoforms in the uterus. We believe that we have outlined the need for further studies in the expression and activation of AKT isoforms in reproductive process; the interaction between AKT and its partners is still widely unexplored. The role of AKT in the complex network of hormonal signaling is also still unclear. The functional redundancy of AKT isoforms is beginning to emerge, but the distinct targets and partners enabling isoform-specific mechanisms are still unclear. We believe that a deeper understanding of this crucial network could allow for better treatments against infertility, endometriosis, and EC.

Funding

This work was supported by NSERC.

References

- Al-Sakkaf KA, Mooney LM, Dobson PR & Brown BL** 2000 Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *J Endocrinol* **167** 85-92.
- Arora V & Quinn MA** 2012 Endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **26** 311-324.
- Asai-Sato M, Nagashima Y, Miyagi E, Sato K, Ohta I, Vonderhaar BK & Hirahara F** 2005 Prolactin inhibits apoptosis of ovarian carcinoma cells induced by serum starvation or cisplatin treatment. *Int J Cancer* **115** 539-544.
- Bansal N, Yendluri V & Wenham RM** 2009 The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* **16** 8-13.
- Berkkanoglu M & Arici A** 2003 Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **50** 48-59.
- Bokhman JV** 1983 Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* **15** 10-17.
- Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI & Handwerger S** 1997 Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* **6** 301-307.
- Brosens JJ, Hayashi N & White JO** 1999 Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **140** 4809-4820.
- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J & Julie Kim J** 2006 Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* **248** 94-103.
- Capp E, Jauckus J, von Eye Corleta H, Toth B, Strowitzki T & Germeyer A** 2011 Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **158** 248-253.
- Caron PL, Frechette-Frigon G, Shooner C, Leblanc V & Asselin E** 2009 Transforming growth factor beta isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **7** 80.

- Chaudhry P & Asselin E** 2009 Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocrine-related cancer* **16** 363-380.
- Chen S, Gai J, Wang Y & Li H** 2011 FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells. *FEBS letters* **585** 1796-1800.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T & Hay N** 2001 Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* **15** 2203-2208.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI & Birnbaum MJ** 2001a Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292** 1728-1731.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F & Birnbaum MJ** 2001b Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* **276** 38349-38352.
- Cinar O, Seval Y, Uz YH, Cakmak H, Ulukus M, Kayisli UA & Arici A** 2009 Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis. *Reprod Biomed Online* **19** 864-871.
- D'Hooghe TM** 1997 Clinical relevance of the baboon as a model for the study of endometriosis. *Fertil Steril* **68** 613-625.
- Denley A, Gymnopoulos M, Kang S, Mitchell C & Vogt PK** 2009 Requirement of phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate in phosphatidylinositol 3-kinase-induced oncogenic transformation. *Molecular cancer research : MCR* **7** 1132-1138.
- Dummler B, Tschopp O, Hynx D, Yang ZZ, Dirnhofer S & Hemmings BA** 2006 Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* **26** 8042-8051.
- Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A & Birnbaum MJ** 2005 Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* **25** 1869-1878.
- Emond V, Asselin E, Fortier MA, Murphy BD & Lambert RD** 2000 Interferon-tau stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bovine lymphocytes and endometrial stromal cells. *Biology of reproduction* **62** 1728-1737.

- Engelman JA** 2009 Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* **9** 550-562.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC & Toker A** 1997 Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275** 665-668.
- Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR & Hemmings BA** 1997 High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **272** 8474-8481.
- Gado K, Pallinger E, Kovacs P, Takacs E, Szilvasi I, Toth BE, Nagy G, Domjan G & Falus A** 2002 Prolactin influences proliferation and apoptosis of a human IgE secreting myeloma cell line, U266. *Immunol Lett* **82** 191-196.
- Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD & Coleman KG** 2003 Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* **112** 197-208.
- Gellersen B & Brosens J** 2003 Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* **178** 357-372.
- Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Vigano P & Di Blasio AM** 2007 PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Molecular human reproduction* **13** 317-322.
- Girouard J, Lafleur MJ, Parent S, Leblanc V & Asselin E** 2013 Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecol Oncol* **128** 335-343.
- Gonzalez E & McGraw TE** 2009 Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 7004-7009.
- Grund EM, Kagan D, Tran CA, Zeitvogel A, Starzinski-Powitz A, Nataraja S & Palmer SS** 2008 Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells. *Mol Pharmacol* **73** 1394-1404.
- Gu C, Zhang Z, Yu Y, Liu Y, Zhao F, Yin L, Feng Y & Chen X** 2011 Inhibiting the PI3K/Akt pathway reversed progesterin resistance in endometrial cancer. *Cancer Sci* **102** 557-564.

- Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ & Gibori G** 1994 Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* **135** 1272-1279.
- Guo RX, Wei LH, Tu Z, Sun PM, Wang JL, Zhao D, Li XP & Tang JM** 2006 17 beta-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **99** 9-18.
- Haslinger P, Haider S, Sonderegger S, Otten JV, Pollheimer J, Whitley G & Knofler M** 2013 AKT isoforms 1 and 3 regulate basal and epidermal growth factor-stimulated SGHPL-5 trophoblast cell migration in humans. *Biology of reproduction* **88** 54.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y & Mills GB** 2005 Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4** 988-1004.
- Honda H, Barrueto FF, Gogusev J, Im DD & Morin PJ** 2008 Serial analysis of gene expression reveals differential expression between endometriosis and normal endometrium. Possible roles for AXL and SHC1 in the pathogenesis of endometriosis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **6** 59.
- Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, Collingwood M, Kirwan J, Williams C & Green JA** 2007 Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration. *Ann Oncol* **18** 409-420.
- Imakawa K, Helmer SD, Nephew KP, Meka CS & Christenson RK** 1993 A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production, ovine trophoblast protein-1. *Endocrinology* **132** 1869-1871.
- Jeong W, Kim J, Bazer FW & Song G** 2014a Proliferation-stimulating effect of colony stimulating factor 2 on porcine trophectoderm cells is mediated by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. *PLoS One* **9** e88731.
- Jeong W, Kim J, Bazer FW & Song G** 2014b Stimulatory Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Proliferation and Migration of Porcine Trophectoderm Cells and Their Regulation by the Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT and Mitogen-Activated Protein Kinase Cell Signaling Pathways. *Biology of reproduction* **90** 50.
- Jeong W, Song G, Bazer FW & Kim J** 2014c Insulin-like growth factor I induces proliferation and migration of porcine trophectoderm cells through multiple cell signaling pathways, including protooncogenic protein kinase 1 and mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Endocrinol* **384** 175-184.

- Kajihara T, Brosens JJ & Ishihara O** 2013 The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Med Mol Morphol* **46** 61-68.
- Kamimura Y & Devreotes PN** 2010 Phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK) activity regulates phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent and -independent protein kinase B activation and chemotaxis. *The Journal of biological chemistry* **285** 7938-7946.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA & Giudice LC** 2002 Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* **143** 2119-2138.
- Ko EM, Walter P, Clark L, Jackson A, Franasiak J, Bolac C, Havrilesky L, Secord AA, Moore DT, Gehrig PA & Bae-Jump VL** 2014 The complex triad of obesity, diabetes and race in Type I and II endometrial cancers: prevalence and prognostic significance. *Gynecol Oncol* **133** 28-32.
- Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND & Buckley AR** 2003 Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* **144** 2102-2110.
- Labied S, Kajihara T, Madureira PA, Fusi L, Jones MC, Higham JM, Varshochi R, Francis JM, Zoumpoulidou G, Essafi A, Fernandez de Mattos S, Lam EW & Brosens JJ** 2006 Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol Endocrinol* **20** 35-44.
- Laudanski P, Szamatowicz J, Kowalczyk O, Kuzmicki M, Grabowicz M & Chyczewski L** 2009 Expression of selected tumor suppressor and oncogenes in endometrium of women with endometriosis. *Human reproduction* **24** 1880-1890.
- Lei W, Feng XH, Deng WB, Ni H, Zhang ZR, Jia B, Yang XL, Wang TS, Liu JL, Su RW, Liang XH, Qi QR & Yang ZM** 2012 Progesterone and DNA damage encourage uterine cell proliferation and decidualization through up-regulating ribonucleotide reductase 2 expression during early pregnancy in mice. *The Journal of biological chemistry* **287** 15174-15192.
- Lemmon MA** 2007 Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp* **81** 81-93.
- Levina VV, Nolen B, Su Y, Godwin AK, Fishman D, Liu J, Mor G, Maxwell LG, Herberman RB, Szczepanski MJ, Szajnik ME, Gorelik E & Lokshin AE** 2009 Biological significance of prolactin in gynecologic cancers. *Cancer research* **69** 5226-5233.

- Liao Y & Hung MC** 2010 Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* **2** 19-42.
- Liu L, Wang Y & Yu Q** 2014 The PI3K/Akt signaling pathway exerts effects on the implantation of mouse embryos by regulating the expression of RhoA. *Int J Mol Med* **33** 1089-1096.
- Lucidi RS, Witz CA, Chrisco M, Binkley PA, Shain SA & Schenken RS** 2005 A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. *Fertil Steril* **84** 16-21.
- Macer ML & Taylor HS** 2012 Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* **39** 535-549.
- Manning BD & Cantley LC** 2007 AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129** 1261-1274.
- Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L & Evangelisti C** 2012 The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta* **1823** 2168-2178.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barriere C, Boespflug-Tanguy O, Dastugue B & Mage G** 2005 DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. *Fertil Steril* **84 Suppl 2** 1180-1190.
- Michael DD, Wagner SK, Ocon OM, Talbot NC, Rooke JA & Ealy AD** 2006 Granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor increases interferon-tau protein secretion in bovine trophectoderm cells. *Am J Reprod Immunol* **56** 63-67.
- Mora A, Komander D, van Aalten DM & Alessi DR** 2004 PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **15** 161-170.
- Mori M, Kitazume M, Ose R, Kurokawa J, Koga K, Osuga Y, Arai S & Miyazaki T** 2011 Death effector domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice. *J Clin Invest* **121** 318-327.
- Muss HB** 1994 Chemotherapy of metastatic endometrial cancer. *Semin Oncol* **21** 107-113.
- Nunley WC, Jr. & Kitchin JD, 3rd** 1980 Congenital atresia of the uterine cervix with pelvic endometriosis. *Arch Surg* **115** 757-758.
- Olive DL & Pritts EA** 2001 Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* **345** 266-275.

- Pant A, Lee, II, Lu Z, Rueda BR, Schink J & Kim JJ** 2012 Inhibition of AKT with the orally active allosteric AKT inhibitor, MK-2206, sensitizes endometrial cancer cells to progestin. *PLoS One* **7** e41593.
- Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG & Hay N** 2003 Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* **17** 1352-1365.
- Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H & Knofler M** 2008 Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology* **149** 979-987.
- Raimondi C & Falasca M** 2011 Targeting PDK1 in cancer. *Curr Med Chem* **18** 2763-2769.
- Rao YP, Buckley DJ & Buckley AR** 1995 Rapid activation of mitogen-activated protein kinase and p21ras by prolactin and interleukin 2 in rat Nb2 node lymphoma cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **6** 1235-1244.
- Riley JK, Carayannopoulos MO, Wyman AH, Chi M, Ratajczak CK & Moley KH** 2005 The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* **284** 377-386.
- Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V & Asselin E** 2012 Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *Int J Cancer* **130** 1755-1767.
- Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, Dutt A, Getz G, Stefansson IM, Raeder MB, Sos ML, Engelsen IB, Trovik J, Wik E, Greulich H, Bo TH, Jonassen I, Thomas RK, Zander T, Garraway LA, Oyan AM, Sellers WR, Kalland KH, Meyerson M, Akslen LA & Beroukhi R** 2009 Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 4834-4839.
- Samartzis EP, Noske A, Dedes KJ, Fink D & Imesch P** 2013 ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *Int J Mol Sci* **14** 18824-18849.
- Sampson JA** 1927 Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* **3** 93-110 143.
- Santi SA & Lee H** 2010 The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol* **298** C580-591.

- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM & Sabatini DM** 2005 Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307** 1098-1101.
- Sharma A & Kumar P** 2012 Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *J Hum Reprod Sci* **5** 2-6.
- Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike-Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T & Taketani Y** 2009 The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *Br J Cancer* **101** 145-148.
- Song MS, Salmena L & Pandolfi PP** 2012 The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13** 283-296.
- St-Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, Parent S & Asselin E** 2004a Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol* **24** 1311-1324.
- St-Germain ME, Gagnon V, Parent S & Asselin E** 2004b Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Molecular cancer* **3** 7.
- Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K & Lalitkumar PG** 2012 Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis. *Human reproduction* **27** 2737-2746.
- Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y & Gibori G** 2001 PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* **142** 4086-4094.
- Thomas CC, Deak M, Alessi DR & van Aalten DM** 2002 High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol* **12** 1256-1262.
- Tierney EP, Tulac S, Huang ST & Giudice LC** 2003 Activation of the protein kinase A pathway in human endometrial stromal cells reveals sequential categorical gene regulation. *Physiol Genomics* **16** 47-66.
- Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J & Hemmings BA** 2005 Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132** 2943-2954.

- van den Brule F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C, Noel A, Frankenne F & Foidart JM** 2005 Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy* **88** 163-180.
- Veillette A, Grenier K, Brasseur K, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Parent S & Asselin E** 2013 Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of reproduction* **88** 79.
- Vilgelm A, Lian Z, Wang H, Beauparlant SL, Klein-Szanto A, Ellenson LH & Di Cristofano A** 2006 Akt-mediated phosphorylation and activation of estrogen receptor alpha is required for endometrial neoplastic transformation in Pten+/- mice. *Cancer research* **66** 3375-3380.
- Wild PJ, Ikenberg K, Fuchs TJ, Rechsteiner M, Georgiev S, Fankhauser N, Noske A, Roessle M, Caduff R, Dellas A, Fink D, Moch H, Krek W & Frew IJ** 2012 p53 suppresses type II endometrial carcinomas in mice and governs endometrial tumour aggressiveness in humans. *EMBO Mol Med* **4** 808-824.
- Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, Stark GR, Kerr IM, Tsushima T, Akanuma Y, Komuro I, Tobe K, Yazaki Y & Kadowaki T** 1998 Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *The Journal of biological chemistry* **273** 15719-15726.
- Yang J, Cron P, Good VM, Thompson V, Hemmings BA & Barford D** 2002 Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* **9** 940-944.
- Yang S, Thiel KW & Leslie KK** 2011 Progesterone: the ultimate endometrial tumor suppressor. *Trends Endocrinol Metab* **22** 145-152.
- Yang ZZ, Tschopp O, Di-Poi N, Bruder E, Baudry A, Dummler B, Wahli W & Hemmings BA** 2005 Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol Cell Biol* **25** 10407-10418.
- Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O & Taketani Y** 2003 Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Molecular human reproduction* **9** 265-269.
- Zhang H, Li M, Zheng X, Sun Y, Wen Z & Zhao X** 2009 Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro. *Molecular human reproduction* **15** 653-663.

Zhang H, Zhao X, Liu S, Li J, Wen Z & Li M 2010 17betaE2 promotes cell proliferation in endometriosis by decreasing PTEN via NFkappaB-dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol* **317** 31-43.

Zhang X, Tang N, Hadden TJ & Rishi AK 2011 Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1813** 1978-1986